DER EINFLUSS VON URIDIN-5-MONOPHOSPHAT, XANTHOSIN-5-MONOPHOSPHAT UND HYPOXANTHIN AUF DIE DURCH ALLOPURINOL INDUZIERTE OROTAZIDURIE

BEATRICE BORCHARDT

1981

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 201 47 74

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545801_0066

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. med. N. Zöllner)

Der Einfluß von Uridin-5-monophosphat, Xanthosin-5-monophosphat und Hypoxanthin auf die durch Allopurinol induzierte Orotazidurie.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Beatrice Borchardt
aus
Augsburg
1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.W.Gröbner
Mitberichterstatter: Prof.Dr.N.Zöllner
Dekan: Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 5.11.1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsübersicht

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... S. 3

A EINLEITUNG ..... S. 4

B ALLGEMEINER TEIL

1.DER PURINSTOFFWECHSEL..... S. 5

1.1.Purinsynthese de novo

1.2.Bereitstellung von Purinnukleotiden durch Wiederverwertung der Basen

1.3.Abbau und Ausscheidung der Purine

1.4.Regulation des Purinstoffwechsels

1.5.Störung des Purinstoffwechsels

2.DER PYRIMIDINSTOFFWECHSEL..... S.16

2.1.Pyrimidinsynthese de novo

2.2.Reutilisation und Umwandlung von Pyrimidinnukleotiden

2.3.Abbau von Pyrimidinverbindungen

2.4.Regulation des Pyrimidinstoffwechsels

2.5.Störung des Pyrimidinstoffwechsels

2.5.1.Hereditäre Orotazidurie

2.5.2.Orotazidurie infolge Fehlens der Ornithin-Transcarbamylase-Aktivität

2.5.3.Orotazidurie mit partiellem Ansprechen auf Folsäure

2.5.4.ß-Aminobuttersäure-Azidurie

2.5.5.Arzneimittelbedingte Orotazidurien

3.BEZIEHUNGEN ZWISCHEN PYRIMIDIN-UND PURINSTOFFWECHSEL S.26

4.ALLOPURINOL S.27

4.1.Pharmakokinetik

4.2.Beeinflussung des Purinstoffwechsels

4.3.Beeinflussung des Pyrimidinstoffwechsels

C EIGENE UNTERSUCHUNGEN
1.PROBLEMSTELLUNG S.32
2.METHODIK S.34
2.1.Versuchspersonen
2.2.Die Formeldiät
2.3.Die Testsubstanzen
2.4.Versuchsablauf und - anordnung
2.5.Analysen
2.5.1.Harnsäure
2.5.2.Kreatinin
2.5.3.Orotsäure
2.5.4.Oxypurine
2.5.5.Eiweiß
2.5.6.Orotidyl-Decarboxylase
2.5.7.Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
2.5.8.Adenin-Phosphoribosyl-Transferase
3.ERGEBNISSE S.67
D DISKUSSION S.80
E ZUSAMMENFASSUNG S.86
LITERATURVERZEICHNIS S.89
LEBENSLAUF S.100

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMP,ADP,ATP	Adenosinmonophosphat,-di- und triphosphat
APRT	Adenin-Phosphophoribosyl-Transferase
CAA	Carbamylaspartat
CAP	Carbamylphosphat
CMP,CDP,CTP	Cytidinmonophosphat,-di- und triphosphat
DHO	Dihydroorotsäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure
GMP	Guanosinmonophosphat
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HS	Harnsäure
HX	Hypoxanthin
IMP	Inosinmonophosphat
ODC	Orotidyl-Decarboxylase
OMP	Orotidinmonophosphat
OP	Oxypurine
OPRT	Orotidin-Phosphoribosyl-Transferase
OS	Orotsäure
PrPP	Phosphoribosyl-pyrophosphat
RNS	Ribonukleinsäure
TMP,TDP,TTP	Thymidinmonophosphat,-di- und triphosphat
UMP,UDP,UTP	Uridinmonophosphat,-di- und triphosphat
XMP	Xanthosinmonophosphat

A EINLEITUNG

Mit der Einführung des Medikamentes Allopurinol im Jahre 1963 war erstmals die Möglichkeit gegeben,bei Gichtpatienten die Harnsäuresynthese in vivo zu hemmen.Im Jahre 1970 beschrieben mehrere Autoren (14,36, 37),daß diese Therapie zu einer signifikanten Erhöhung der Orotsäureausscheidung führt,folglich also nicht nur den Purin-,sondern auch den Pyrimidinstoffwechsel beeinflußt.

1971 fanden Zöllner und Mitarbeiter (71),daß diese medikamentös induzierte Orotazidurie durch orale Gaben von Ribonukleinsäure (RNS) und RNS-Hydrolysat teilweise aufgehoben werden kann.In weiteren Untersuchungen wurden daraufhin die einzelnen Bestandteile der RNS,Purin-und Pyrimidinnukleotide,auf ihren Einfluß auf die Regulationsmechanismen des Pyrimidinstoffwechsels hin geprüft.

Im Rahmen dieser Versuchsreihen wurden in der vorliegenden Arbeit die folgenden drei Substanzen getestet:

-Hypoxanthin,eine Purinbase
-Xanthosinmonophosphat,ein Purinnukleotid
-Uridinmonophosphat,ein Pyrimidinnukleotid.

B ALLGEMEINER TEIL

1. DER PURINSTOFFWECHSEL

Der menschliche Purinstoffwechsel ist,nicht zuletzt wegen seiner Bedeutung für die Pathogenese der Gicht, intensiv untersucht worden und recht gut bekannt.Sein Endprodukt,die Harnsäure,wurde bereits 1797 von Wallaston mit der Gicht in Zusammenhang gebracht.Die Harnsäure bildet beim Menschen den Hauptweg der Purinstickstoffausscheidung.

1.1. Purinsynthese de novo(s.Abb.1 und 2)

Ausgangssubstanz ist 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat(PrPP),entstanden durch die Übertragung der letzten Pyrophosphatgruppe von ATP auf Ribose-5-phosphat.Dieses PrPP und die Amid-Gruppe des Glutamin reagieren,katalysiert durch das Enzym Glutamin-PrPP-Amidotransferase,unter Abspaltung von Pyrophosphat zu 5-Phosphoribosylamin(26).Da dieser Reaktionsschritt irreversibel ist,scheint er für die Regulation der Purinbiosynthese von Bedeutung zu sein(s.u.).5-Phosphoribosylamin kondensiert mit Glycin unter Mitwirkung von ATP zum Amid.Der Imidazolring wird durch Einfügung eines C-Atoms, das von Formyl-tetrahydrofolsäure übertragen wird, vorbereitet.Nachdem noch eine Stickstoffgruppe eingefügt wurde,wird der Imidazolring geschlossen,wobei ein Mol ATP verbraucht wird.Dann tritt Kohlensäure als Bikarbonat in das Molekül ein;bemerkenswert ist,daß dabei keine Aktivierung durch ATP erforderlich ist,die Reaktion ist frei reversibel. Die Säure wird in das Amid übergeführt,der Stickstoff entstammt der Asparaginsäure,die in Fumarsäure übergeht.Während all dieser enzymatischen Reaktionen bleibt die Phosphoribose am Molekül haften.Schließlich wird der Sechsring geschlossen,wie

beim Fünfring unter Eintritt einer aktivierten Ameisensäure.Als erstes Purinderivat entsteht damit die Inosinsäure (IMP),die als freies Nukleotid im Muskel vorkommt.
Hervorzuheben ist,daß im Gegensatz zur Pyrimidinsynthese im Purinstoffwechsel ausgehend vom Ribosephosphat das Mononukleotid und nicht die freie Base synthetisiert wird.

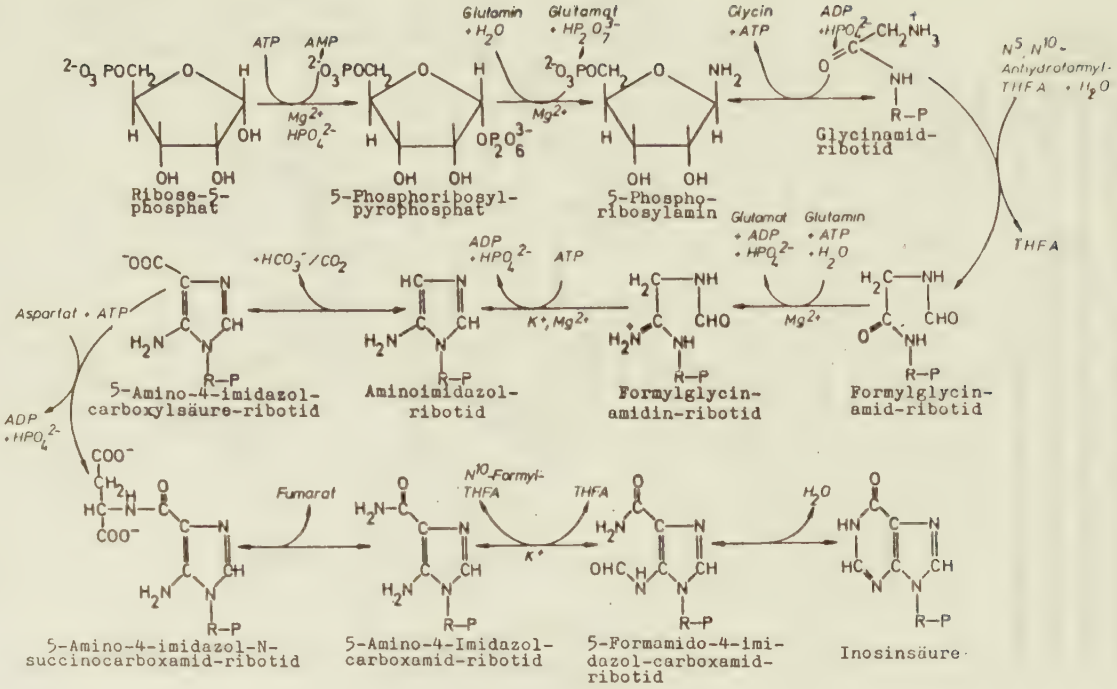


Abb.1: Biosynthese de novo der Inosinsäure (27)

Inosinsäure ist die Muttersubstanz der beiden Purinnukleotide Adenosin-5-phosphat(AMP) und Guanosin-5-phosphat(GMP).Der Schritt vom IMP zu GMP vollzieht sich über das Zwischenprodukt Xanthosin-5-phosphat(XMP),welches im Versuch als Testsubstanz eingesetzt wurde.

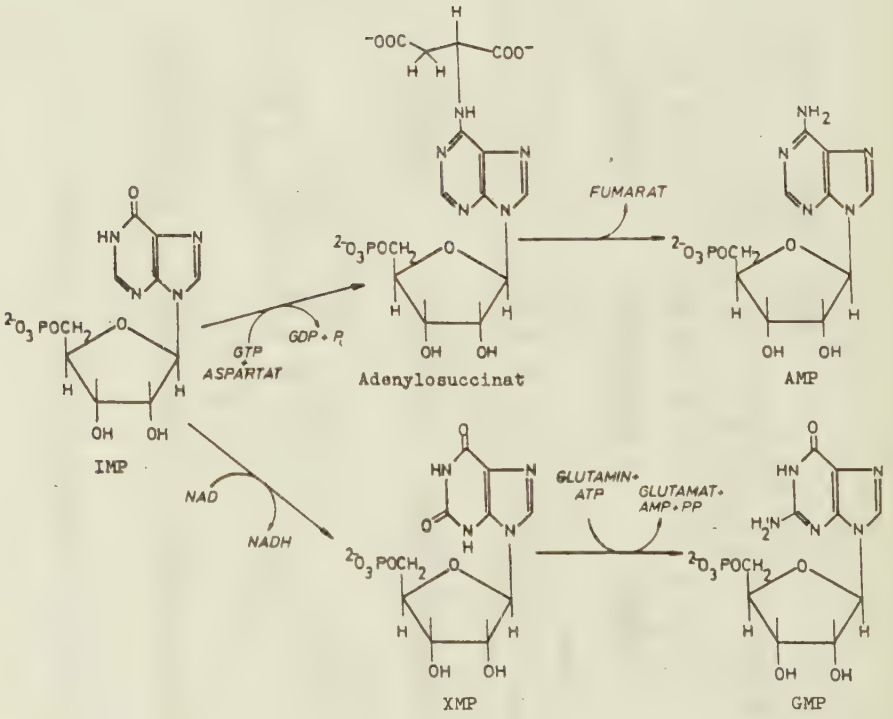


Abb.2: Biosynthese von AMP und GMP (27)

1.2. Bereitstellung von Purinnukleotiden durch Wiederverwertung der Basen und Nukleoside

Neben der de novo Synthese werden dem Nukleotid-Turnover oder der Nahrung entstammende Basen und Nukleoside zu Mononukleotiden resynthetisiert (12, 41,42,53). Hierzu sind zwei verschiedene Wege bekannt:

a) Durch Reaktion mit PrPP können freie Basen zu Ribonukleotiden verbunden werden.
   Base + PrPP --→ Nukleotid + Pyrophosphat
   Die Reaktion wird katalysiert durch sog. Phosphoribosyltransferasen, z.B. Adenin-Phosphoribosyl-Transferase (APRT) und Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT).

b) Für Guanin existiert ein zweiter Syntheseweg; die freie Base reagiert mit Ribose-1-phosphat zum Nukleosid und dann, katalysiert durch eine Nukleosidkinase, in einer Energie verbrauchenden Reaktion zum Nukleotid.
   Base + Ribose-1-phosphat --→ Nukleosid + Phosphat
   Nukleosid + ATP --→ Nukleotid + ADP
   Bedeutungsvoll erscheint diese Art der Wiederverwertung aufgrund der Tatsache, daß dabei jeweils nur eine energiereiche Verbindung in Form von PrPP oder ATP verbraucht wird, während die Purinbiosynthese de novo mindestens sechs energiereiche Verbindungen erfordert.

1.3.Abbau und Ausscheidung der Purine

Überschüssige Purinbasen werden in Harnsäure umgewandelt,außerdem werden geringe Mengen Hypoxanthin und Xanthin unverändert ausgeschieden.Die Harnsäurebildung findet hauptsächlich in Leber und Dünndarm statt.Vom Guanosin wird zunächst die Ribose abgespalten,das entstandene Guanin wird zu Xanthin desaminiert.Adenosin wird als Nukleosid zu Inosin desaminiert;durch phosphorolytische Abspaltung der Ribose entsteht Hypoxanthin,welches durch die Xanthinoxydase ebenfalls zu Xanthin oxydiert wird. Der letzte gemeinsame Schritt ist die Umwandlung von Xanthin zu Harnsäure.Beim Menschen und höheren Affen wird die Harnsäure unverändert ausgeschieden, andere Säugetiere bauen sie mit dem Enzym Uricase weiter zu Allantoin ab.(s.Abb.3)

Die Harnsäureausscheidung erfolgt zu ungefähr 80% über die Nieren.Die Harnsäure wird renal fast vollständig filtriert,im proximalen Tubulus nahezu total rückresorbiert und im proximalen - wahrscheinlich auch im distalen - Tubulus aktiv sezerniert. Alle Einzelheiten dieser Schritte sind noch nicht bekannt.Die restlichen etwa 20% der Harnsäure werden in den Magen-Darm-Trakt abgegeben und bakteriell zersetzt.

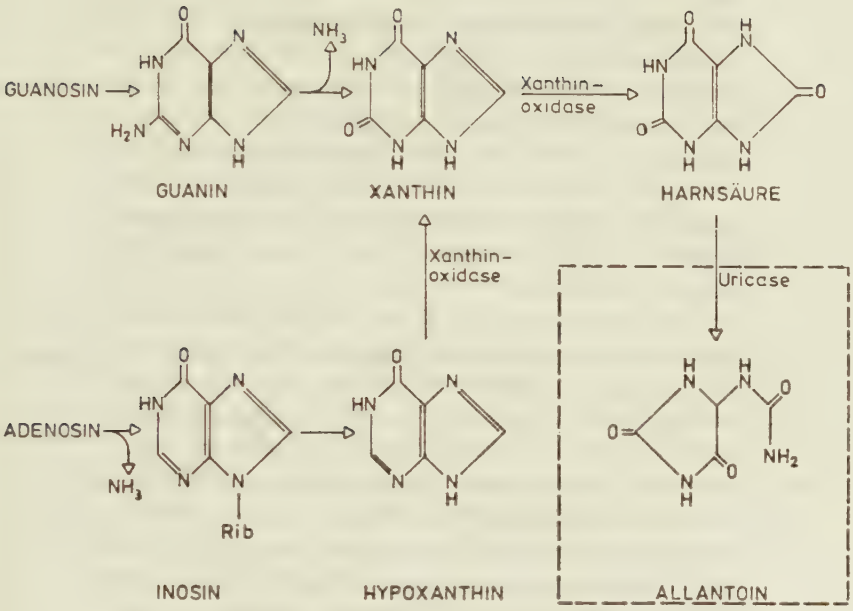


Abb.3: Abbau der Purinbasen (34)

1.4. Regulation des Purinstoffwechsels

Das Enzym Glutamin-PrPP-Amidotransferase ① katalysiert den ersten Schritt der Purinbiosynthese. Die Purinnukleotide AMP, IMP und GMP hemmen in vitro durch einen Rückkoppelungsmechanismus die Aktivität dieses Enzyms, sog. "Endproduktrepression", und damit den ersten und wichtigsten Schritt für die Neubildungsrate an Purinen (28,64). Bei fehlender Hemmung von ① kommt es folglich zur Steigerung der Purinsynthese.

AMP und GMP hemmen nicht nur die Glutamin-PrPP-Amidotransferase, sondern beeinflussen im Sinne eines Rückkoppelungseffektes auch ihre eigene Entstehung aus IMP. Außerdem wird die intrazelluläre Konzentration von AMP, IMP und GMP auch von der Aktivität der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) ② und Adenin-Phosphoribosyltransferase (APRT) ③ beeinflusst. Man nimmt an, daß nach Produktion ausreichender Mengen dieser Nukleotide die Neusynthese der Purine im Sinne eines Feed-back-Mechanismus gebremst wird (21).

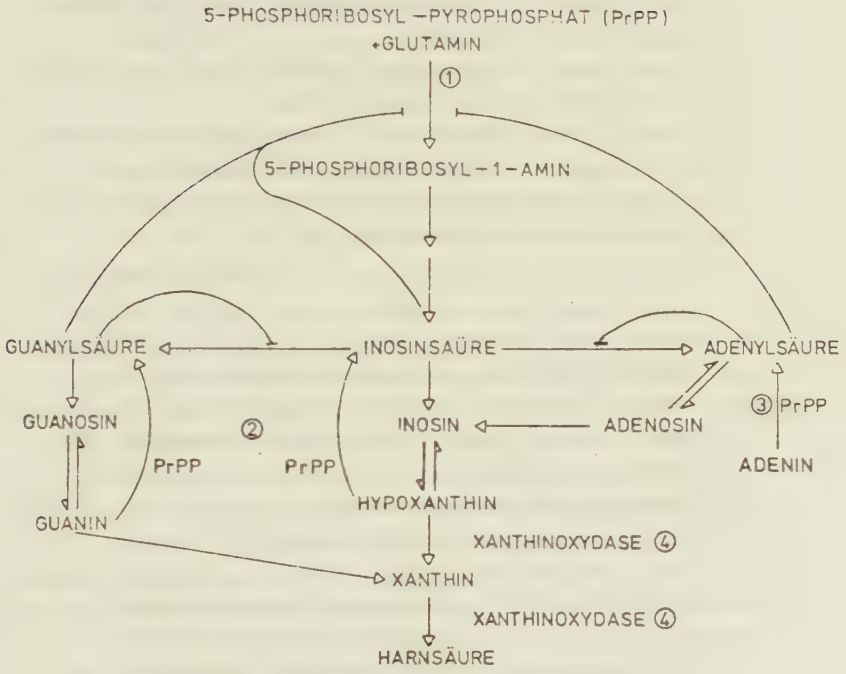


Abb.4: Schematische Darstellung des Purinstoff-wechsels und seiner Regulation (57)

① :Glutamin-PrPP-Amidotransferase
② :Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
③ :Adenin-Phosphoribosyl-Transferase
④ :Xanthinoxydase

1.5. Störungen des Purinstoffwechsels

Eine Störung der Purinbiosynthese kann auf folgenden Ursachen beruhen:

a) Auf einer Änderung der Konzentration der Schlüsselsubstrate PrPP und Glutamin.

b) Auf einer Änderung der Aktivität des Schlüsselenzyms, der Glutamin-PrPP-Amidotransferase.

c) Auf einer Änderung der intrazellulären Konzentration von AMP, GMP und IMP.

Ob Konzentrationsänderungen von Glutamin die Purinbiosynthese de novo beeinflussen können, ist bis jetzt nicht gesichert. Dagegen scheint dies für das PrPP zu gelten. Die intrazelluläre Konzentration von PrPP stellt die Resultierende aus Synthese und Verbrauch dar. Eine Störung dieses Gleichgewichtes muß zu einer Änderung der intrazellulären PrPP-Konzentration, und damit möglicherweise zu einer Änderung der Harnsäuresynthese führen.

-1962 beobachteten Jones et al. bei einem Teil ihrer Gichtpatienten mit vermehrtem Harnsäureanfall erhöhte intrazelluläre Konzentrationen von PrPP (33).

-1972 wurde ein Gichtpatient mit vermehrter PrPP- und Harnsäureproduktion beobachtet, der eine gesteigerte Aktivität der PrPP-Synthetase aufwies, also des Enzyms, welches die Synthese von PrPP aus Ribose-5-phosphat und ATP katalysiert (60).

-1973 wurde ein weiterer Gichtpatient mit erhöhter Aktivität der PrPP-Synthetase beschrieben (4). Daraus ließ sich schließen, daß eine Erhöhung der PrPP-Synthetase-Aktivität zu einer gesteigerten Harnsäuresynthese und damit zur Entwicklung einer Gicht führen kann.

Erhöhte intrazelluläre Konzentrationen von PrPP finden sich auch bei Gichtpatienten mit verminderter Aktivität der HGPRT bzw. deren vollständi-

gem Fehlen (Lesch-Nyhan-Syndrom).Dieser Enzymdefekt wird x-chromosomal rezessiv vererbt.Das Enzym katalysiert die Umwandlung der Purine Guanin und Hypoxanthin in die Nukleotide GMP und IMP.Diese Nukleotide hemmen durch einen Rückkoppelungsmechanismus den ersten Schritt der Purinbiosynthese. Neben der verringerten Feedback-Hemmung durch GMP und IMP ist an der Steigerung der Purinsynthese de novo ursächlich eine erhöhte PrPP-Konzentration nachweisbar.

Es sei hier darauf hingewiesen,daß die obengenannten Störungen der Purinbiosynthese zu einer Form der primären Gicht führen,die durch vermehrte Harnsäureproduktion gekennzeichnet ist.Demgegenüber handelt es sich bei der überwiegenden Mehrzahl der klinischen Fälle von primärer Hyperuricämie (wahrscheinlich bis zu 98%) um einen renalen Sekretionsdefekt.
Hiervon abzugrenzen sind weiterhin die sekundären Hyperuricämien auf Grund von vermehrtem Harnsäureanfall,wie zum Beispiel bei Hämoblastosen oder vermehrter Zufuhr von Nahrungspurinen,beziehungsweise auf Grund von verminderter Harnsäureausscheidung,zum Beispiel bei Erkrankungen der Niere (20).

2. DER PYRIMIDINSTOFFWECHSEL

Die einzelnen Schritte des Pyrimidinstoffwechsels wurden erst relativ spät aufgeklärt.Ein Grund hierfür war sicher,daß im Gegensatz zur Harnsäure als Endprodukt des Purinstoffwechsels,die Endprodukte des Pyrimidinstoffwechsels-ß-Alanin und ß-Aminoisobuttersäure-in Mengen von wenigen Milligramm ausgeschieden werden und dementsprechend schwer faßbar sind.Außerdem sind die wenigen bekannten Krankheiten des Pyrimidinstoffwechsels entweder extrem selten oder klinisch unbedeutend.

2.1. Pyrimidinsynthese de novo (s.Abb.5)

Der erste Schritt führt beim Menschen zur Bildung von Carbamylphosphat(CAP).Carbamylphosphat ist Vorläufer von Citrullin im Harnstoffcyclus und von Carbamylaspartat(CAA) in der Pyrimidinbiosynthese.Bei Säugern lenken zwei verschiedene Enzyme,Carbamylphosphat-Synthetase I und II, die Carbamylgruppe in die entsprechenden Stoffwechselbahnen (32,39):

-Die CAP-Synthetase I,die zu Citrullin und dem Harnstoffcyclus führt,benutzt NH_4^+ als Stickstoffdonator und braucht Acetylglutamat als Cofaktor.

-Im Gegensatz dazu liefert Glutamin die Stickstoffquelle für das für die Pyrimidine bestimmte Carbamylphosphat,katalysiert durch CAP-Synthetase II (25,31,44):

$$2ATP + Glutamin + HCO_3 + H_2O \rightarrow CAP + 2ADP + P_1 + Glutamat$$

Die CAP-Synthetase II bildet mit den Enzymen Aspartat-Transcarbamylase (ATC) und Dihydroorotase (DHO) einen Komplex (29).ATC katalysiert die Synthese des Carbamylaspartat (CAA) aus CAP und L-Aspartat.Der Pyrimidinring wird durch reversible Dehydratation von Carbamylaspartat (CAA) zu Di-Hydroorotsäure (DHO) gebildet.

Aus DHO entsteht durch Oxidation Orotsäure (OS); dieser Schritt wird katalysiert durch das Enzym Dihydroorotsäure-Dehydrogenase.Orotsäure (OS) wird in Gegenwart von PrPP und Mg^{++}-Ionen durch das Enzym Orotsäure--Phosphoribosyl-Transferase (OPRT) zum ersten Pyrimidinnukleotid,Orotidin-5-phosphat (OMP),aufgebaut.
Diese Verbindung wird dann durch Orotidin-5-phosphat-Decarboxylase (ODC) irreversibel decarboxyliert,es entsteht Uridin-5-phosphat (UMP). OPRT und ODC bilden im Säugetierorganismus einen Enzymkomplex (13).
UMP wird in zwei Schritten zu UDP und UTP umgewandelt,wobei jeweils ein ATP verbraucht wird:

UMP + ATP --→ UDP + ADP
UDP + ATP --→ UTP + ADP

Aus UTP und Glutamin entsteht in einer ebenfalls Energie in Form von ATP verbrauchenden Reaktion CTP:
UTP + Glutamin + ATP --→ CTP + Glutamat + P_1 + ADP

Die Synthese von Thymidinmonophosphat,dem Uridinanalog der DNS,erfolgt durch Methylierung von Desoxyuridin-5-phosphat (dUMP),katalysiert durch Thymidil-Synthetase:
dUMP + Methylentetrahydrofolsäure --→ TMP + Dehydrofolat
TMP wird,wie die Uridin-und Cytidinnukleotide,zu TTP in ATP verbrauchenden Schritten umgewandelt.

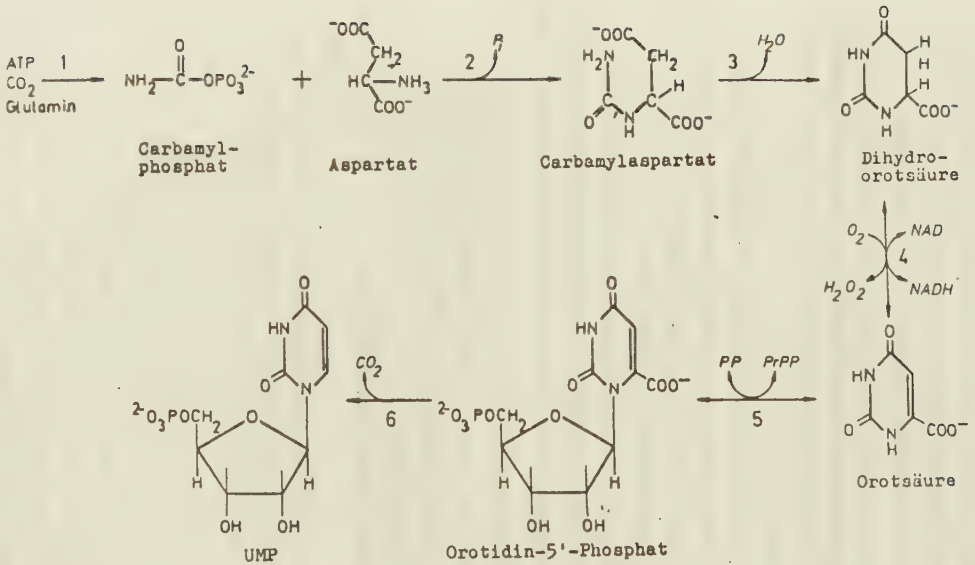


Abb.5: Pyrimidinbiosynthese de novo (35)
(1=Carbamylphosphat-Synthetase;2=Aspartat-Transcarbamylase;
3=Dihydroorotase;4=Dihydroorotsäure-Dehydrogenase;5=OPRT;6=ODC)

2.2.Reutilisation und Umwandlung von Pyrimidinnukleotiden

Neben der sogenannten de novo Synthese können die Pyrimidinnukleotide auch direkt aus Pyrimidinbasen oder Nukleosiden,die dem Nukleotid-Turnover oder der Nahrung entstammen,aufgebaut werden.Bis zu welchem Grad dies beim Menschen geschieht ist nicht bekannt,es ist jedoch erwiesen,daß Uridin in größerer Menge reutilisiert wird als Uracil(63).
Die Möglichkeit der Umwandlung von Pyrimidinnukleotiden untereinander wurde bereits beschrieben.

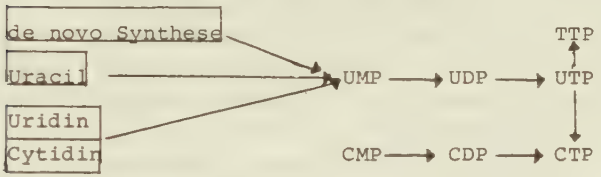


Abb.6: Umwandlung von Pyrimidinnukleotiden(22)

2.3.Abbau von Pyrimidinverbindungen

Der Abbau der Pyrimidine verläuft als Umkehr der Biosynthese.Nach Abspaltung des Ribosylphosphatrestes wird der Pyrimidinring hydriert und hydrolytisch geöffnet.Da jedoch beim Übergang von Orotsäure zu Uridin Kohlendioxyd abgespalten wird, erscheint als Abbauprodukt nicht Asparaginsäure, sondern beim Abbau des Uridin das Decarboxylierungsprodukt ß-Alanin,beziehungsweise beim Thymin die ß-Aminoisobuttersäure.

2.4. Regulation des Pyrimidinstoffwechsels

Das erste spezifische Enzym für die Pyrimidinsynthese, die CAP-Synthetase II, scheint der wichtigste Angriffspunkt für die Feed-back-Hemmung der de novo Synthese durch Pyrimidinnukleotide in höheren Organismen zu sein (46).

Weitere Kontrollmöglichkeiten betreffen die Dihydroorotase, deren Aktivität durch eine Anzahl von Pyrimidinen und Purinen beeinflußt wird (6), sowie die Orotidyl-Decarboxylase, die durch ihr Endprodukt UMP gehemmt wird (s.u.).

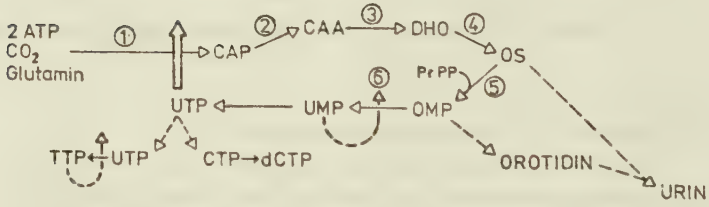


Abb.7: Regulationsmechanismen des Pyrimidinstoffwechsels (47)

2.5.Störungen des Pyrimidinstoffwechsels

2.5.1.Hereditäre Orotazidurie (Typ I und II)

Die hereditäre Orotazidurie ist eine seltene, autosomal rezessiv vererbte Erkrankung des Pyrimidinstoffwechsels,die mit einer gegen Folsäure resistenten megaloblastären Anämie,Leukopenie,Wachstums-und Entwicklungsverzögerung sowie einer exzessiven renalen Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin einhergeht (59).
Der für die Orotsäureausscheidung verantwortliche molekulare Defekt ist das Fehlen der Aktivitäten der Enzyme Orotatphosphoribosyl-Transferase (OPRT) und Orotidyl-Decarboxylase (ODC).Kinder mit dieser Erkrankung scheiden täglich 1-1,5g Orotsäure aus,der Normalwert liegt bei 1,4mg/die (68).Die klinischen Erscheinungen dürften die Folge eines Mangels an Pyrimidinnukleotiden sein,die endogen nicht gebildet werden können.Im einzelnen sind die pathophysiologischen Zusammenhänge noch nicht geklärt.
Trotz ihrer Seltenheit erregte die Orotazidurie besonderes Interesse,da es sich
-um die bis jetzt einzige klar definierte Störung des Pyrimidinstoffwechsels handelt und
-bei der häufigeren Form,der hereditären Orotazidurie Typ I,ein Doppelenzymdefekt vorliegt.
Sieben der bisher beschriebenen acht Patienten mit hereditärer Orotazidurie wiesen eine ausgeprägte Verminderung der Aktivität von OPRT und ODC in den Erythrocyten auf.Auch in Leukocyten, Lebergewebe (54) sowie Fibroblasten (59) konnten diese Enzymdefekte nachgewiesen werden.
Bei dem von Fox und Mitarbeitern 1969 beschriebenen (15) Typ II der hereditären Orotazidurie (1 Patient) fand sich lediglich ein Fehlen der ODC-Aktivität.

Die exzessive Orotsäureausscheidung im Urin bei Patienten mit hereditärer Orotazidurie beruht vermutlich nicht nur auf der Hemmung der Umwandlung von Orotsäure zu Uridin-5-monophosphat, sondern auch auf einer gesteigerten Pyrimidinsynthese de novo, die auf verminderte Endprodukthemmung zurückzuführen ist.
Die Verabreichung von Uridin führt zu einer deutlichen Abnahme der renalen Orotsäureausscheidung sowie einer wesentlichen Besserung der klinischen Befunde (5,307. Absetzen der Uridinbehandlung geht mit einem Wiederauftreten der klinischen Manifestationen einher.
Im Gegensatz zu den homozygoten Erbträgern der hereditären Orotazidurie Typ I weisen heterozygote lediglich eine verminderte Aktivität beider Enzyme auf. Klinische Manifestationen wurden bei heterozygoten Erbträgern nicht beobachtet.

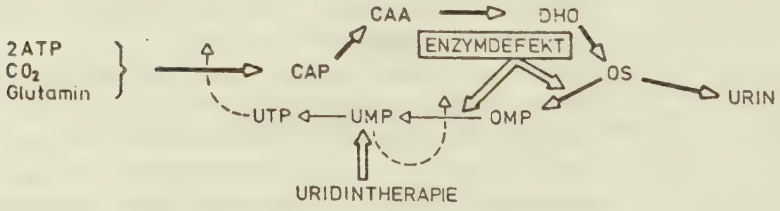


Abb.8: Hereditäre Orotazidurie Typ I (47)

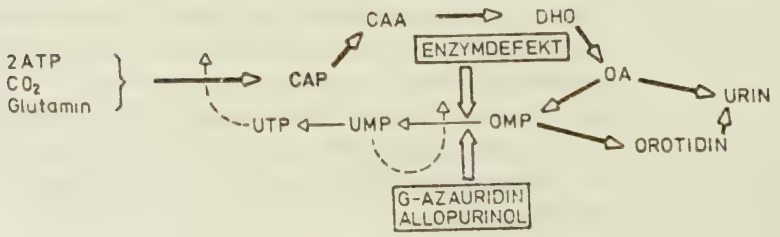


Abb.9: Hereditäre Orotazidurie Typ II (47)

2.5.2. Orotazidurie infolge Fehlens der Ornithin-Transcarbamylase-Aktivität

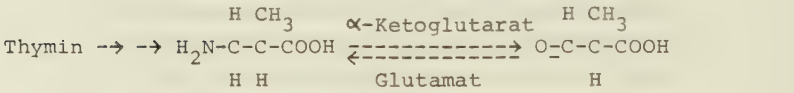
Eine erhöhte Ausscheidung von Orotsäure, Uracil und Uridin ist bei Kindern mit Ornithin-Transcarbamylasemangel beschrieben worden(45,49).Diese Patienten wiesen eine erhöhte Pyrimidinsynthese auf.Sie beruht, infolge Hemmung der Citrullinsynthese,auf einer Anreicherung von Carbamylphosphat, einem Substrat der Aspartat-Transcarbamylase(45).Durch Zufuhr einer eiweißarmen Diät konnte in einem Fall ein deutlicher Abfall der Orotsäureausscheidung erzielt werden.

2.5.3. Orotazidurie mit partiellem Ansprechen auf Folsäure

Neimann und Mitarbeiter berichteten 1965(51) über einen drei Monate alten Jungen mit ausgeprägter Anämie,megaloblastären Veränderungen des Knochenmarks sowie einer vermehrten renalen Orotsäureausscheidung.Die hämatologischen Veränderungen sprachen partiell auf Folsäure an.Therapeutische Versuche mit Vitamin B_{12},Pyridoxin,Uridin,Thymin, Thymidin und Cytidin waren erfolglos.Bestimmungen der Aktivität der Orotatphosphoribosyl-Transferase und Orotidyl-Decarboxylase wurden nicht durchgeführt;es scheint möglich,daß es sich auch bei dieser Erkrankung um eine spezifische Störung des Pyrimidinstoffwechsels handelt(47).

2.5.4. ß-Aminoisobuttersäure-Azidurie

Die einzige bekannte Störung des Pyrimidinabbaus, ß-Aminoisobuttersäure-Azidurie, ist eine gutartige hereditäre Störung, die bei 5-10% der Kaukasusbewohner und zu einem noch höheren Prozentsatz bei Asiaten vorkommt (47). Die Aminosäure erscheint beim Abbau des Thymin und wird normalerweise zu Methylmalonsäure-Semialdehyd transaminiert.



ß-Aminoisobuttersäure — Methylmalonsäure-Semialdehyd

Man nimmt an, daß die ß-Aminoisobuttersäure-Azidurie durch einen Enzymdefekt bei dieser Transamination zustande kommt, was bis jetzt jedoch noch nicht nachgewiesen werden konnte. Die Aminoazidurie wirkt sich biologisch in keiner Weise nachteilig aus (47).

2.5.5. Arzneimittelbedingte Orotazidurien

Zwei Pharmaka führen beim Menschen zu Orotazidurie und Orotidinurie. Das Cytostatikum 6-Azauridin, das in der Therapie von akuten Leukämien, Psoriasis und Mycosis fungoides verwendet wird, ist nach seiner Umwandlung zu 6-Azauridylsäure ein kompetitiver Hemmer der Orotidyl-Decarboxylase. Seine Verwendung

in therapeutischen Dosen simuliert die hereditäre Orotazidurie Typ II und führt zu einer erhöhten Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin.Wie bei der hereditären Störung führt die fehlende Endproduktthemmung zu einer Steigerung der de novo Synthese von Pyrimidinen (s.S.25).Gleichzeitig kommt es zu einer Erhöhung der renalen Harnsäureausscheidung,die zum Teil der uricosurischen Wirkung von 6-Azauridin,zum Teil aber auch dem uricosurischen Effekt der Orotsäure zugeschrieben wird (11).

Das zweite Pharmakon ist Allopurinol,das in therapeutischen Dosen ebenfalls zum kompetitiven Hemmer der Orotidyl-Decarboxylase wird und somit zu einer Orotidin-und Orotazidurie führt.Hierauf wird in einem gesonderten Abschnitt noch näher eingegangen.

3.BEZIEHUNGEN ZWISCHEN PYRIMIDIN- UND PURINSTOFFWECHSEL

Purin-und Pyrimidinnukleotide sind Bausteine der Desoxyribonukleinsäure und Ribonukleinsäure und in dieser Verbindung verantwortlich für die Speicherung der genetischen Information und für die Biosynthese der Proteine. Zwischen Purin-und Pyrimidinstoffwechsel bestehen enge Beziehungen.In der Regulation dieser Beziehungen nimmt möglicherweise 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat (PrPP) eine zentrale Stellung ein.So kann eine erhöhte Konzentration dieser Verbindung zu einer vermehrten Harnsäureproduktion führen (65).Umgekehrt könnte die dem Pyrimidinaufbau entstammende Orotsäure die Purinsynthese de novo hemmen,indem sie durch Aufbau zum Nukleotid den intrazellulären PrPP-Spiegel senkt.
Bessere Erkenntnisse über diese Interaktionen sollen weitere Versuchsreihen mit der experimentell erzeugten Orotazidurie bringen.

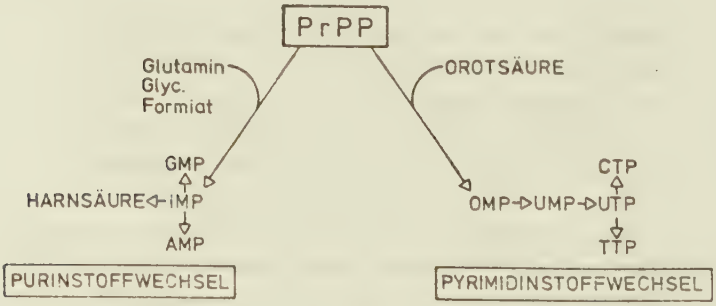


Abb.10: Zentrale Stellung des PrPP

4.ALLOPURINOL

Allopurinol,das ursprünglich als Hemmstoff für die Oxidation des 6-Mercaptopurins entwickelt wurde,erwies sich bei leukämischen Patienten,denen diese beiden Substanzen gleichzeitig verabreicht wurden,als Hemmstoff der Harnsäurebildung (56) und kam daraufhin zum Einsatz in der Behandlung der Hyperuricämie.
Die Harnsäure-senkende Wirkung beruht auf einer Hemmung der Xanthinoxydase;dieses Enzym katalysiert die Oxidation von Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure,von 6-Mercaptopurin zu 6-Mercaptoharnsäure und von Allopurinol zu Oxipurinol.

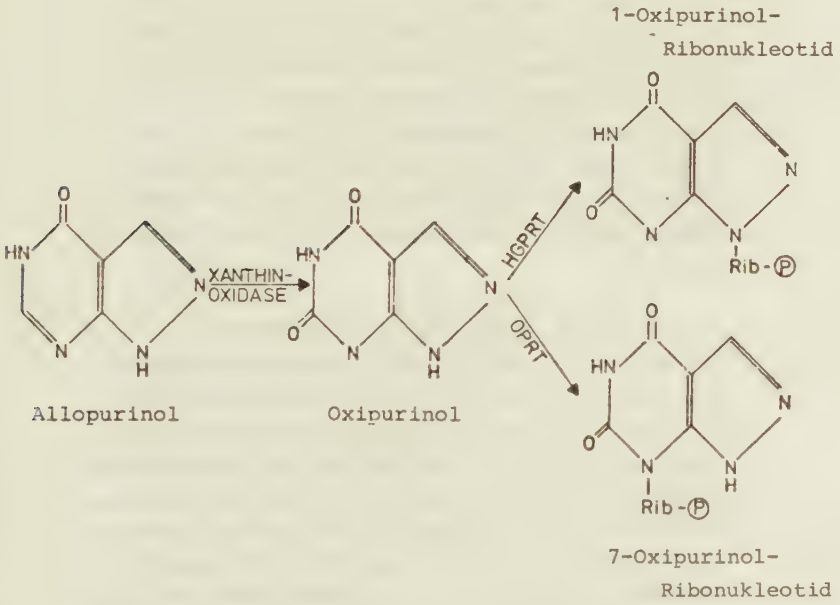


Abb.11: Die Umwandlung von Allopurinol zu Oxipurinol und dessen Ribonukleotid-Derivate

4.1.Pharmakokinetik

Allopurinol wird rasch aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert und ist im Plasma 30-60min nach oraler Verabreichung nachweisbar.Weder Allopurinol noch sein Hauptmetabolit Oxipurinol sind im Plasma an Protein gebunden(10).Etwa 20% der oral eingenommenen Dosis werden nach 48-72Std. in den Faeces gefunden.Die Verteilung von Allopurinol und Oxipurinol erfolgt gleichmäßig im Gesamtkörperwasser.Lediglich im Gehirn ist die Konzentration beider Verbindungen etwa 50% niedriger als in anderen Geweben(18).Allopurinol wird rasch metabolisiert.Die biologische Halbwertszeit beträgt nur 2-3Std.(10).Etwa 3-10% werden im Urin unverändert ausgeschieden.Der größte Teil wird in vivo zu Oxipurinol oxydiert,ein kleinerer Teil zu Allopurinolribonukleosid(43)und Allopurinolribonukleotid(17)umgewandelt.
Oxipurinol wird größtenteils unverändert im Urin ausgeschieden,seine biologische Halbwertszeit beträgt ca.28 Stunden(10).Ein kleinerer Teil des Oxipurinols wird zu Ribosiden und Ribotiden metabolisiert.

4.2.Beeinflussung des Purinstoffwechsels

Allopurinol hemmt die Xanthinoxydase;infolgedessen kommt es unter Allopurinol zu einem Abfall der Serumharnsäure und renalen Harnsäureausscheidung bei gleichzeitigem Anstieg der Ausscheidung von Hypoxanthin und Xanthin im Urin.Die Verringerung der renalen Harnsäureausscheidung wird jedoch meist nicht durch eine vermehrte Oxypurinelimination ersetzt(56).Dieser Tatbestand legte die Vermutung nahe,daß Allopurinol auch zu einer Beeinflussung der Purinsynthese de novo führt.
Mehrere Mechanismen machen diese Hypothese wahrscheinlich:

-Das Ribonukleotid des Allopurinols hemmt in vitro das Schlüsselenzym der Purinsynthese de novo,die Glutamin-PrPP-Amidotransferase sowohl der Taubenleber als auch des Menschen(50,28).
-Allopurinol führt durch Hemmung der Xanthinoxydase zu einer vermehrten Bildung von IMP aus Hypoxanthin.IMP,sowie AMP und GMP sind allosterische Inhibitoren der PrPP-Amidotransferase(38).
-Orale Einnahme von Allopurinol führt innerhalb von 3-5 Stunden zu einem Abfall der PrPP-Konzentration in Erythrocyten,was zu einer verminderten Purinsynthese de novo führt.Erklärt wird dieser Abfall mit der Bildung von Allopurinolribonukleotid(17).
Wahrscheinlich läßt sich der Einfluß von Allopurinol auf die Purinsynthese de novo auf alle drei Mechanismen zurückführen,wobei die quantitative Relevanz noch offen ist.Eine entscheidende Rolle spielt dabei jedenfalls die HGPRT,die die Ribonukleotidbildung katalysiert.So führt Allopurinol bei Patienten mit verminderter HGPRT-Aktivität zu keiner Beeinflussung der Purinsynthese de novo.

4.3.Beeinflussung des Pyrimidinstoffwechsels
Während Allopurinolbehandlung in der üblichen therapeutischen Dosis wurde auch ein Anstieg der renalen Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin beobachtet(17,36,37).Dieser Anstieg ist auf eine Hemmung des Enzyms Orotidyl-Decarboxylase zurückzuführen,das für die Umwandlung von OMP zu UMP verantwortlich ist;Allopurinol simuliert also ebenfalls,wenn auch in geringerem Maße als 6-Azauridin,die hereditäre Orotazidurie Typ II.

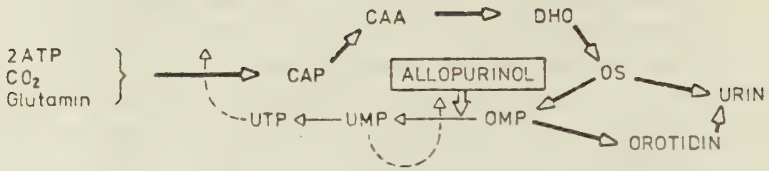


Abb. 12: Beeinflussung des Pyrimidinstoffwechsels durch Allopurinol
Phänokopie der hereditären Orotaziдurie Typ II

In vitro Untersuchungen ergaben, daß Xanthin- und Allopurinolribonukleotid ausgeprägte Inhibitoren der ODC sind (36).Da beide Ribonukleotide aus ihren Basen in Gegenwart von PrPP und HGPRT synthetisiert werden, wurde zuerst angenommen, daß die Hemmung der Pyrimidinsynthese durch Allopurinol nur bei Personen mit normaler Aktivität der HGPRT möglich ist.Die Beobachtung, daß auch Patienten mit Lesch-Nyhan-Syndrom, die einen Verlust der HGPRT-Aktivität aufweisen, nach Verabreichung von Allopurinol eine vermehrte Ausscheidung von Orotidin und Orotsäure zeigten (2,13), war jedoch mit dieser Hypothese nicht in Einklang zu bringen.
Neuere Untersuchungen ergaben, daß Orotatphosphoribosyl-Transferase, die mit ODC einen Enzymkomplex bilden soll, ebenfalls an der Bildung eines Inhibitors der Decarboxylase beteiligt ist (3).Ähnliche Studien zeigten, daß diese Hemmung der ODC auf die Bildung eines durch Orotatphosphoribosyl-Transferase synthetisierten Ribonukleotidderivates von Oxipurinol zurückzuführen ist (13).Die Folgerung war, daß in vivo

wahrscheinlich zwei verschiedene Oxypurinmetaboliten synthetisiert werden: (s.Abb.11)
Die durch HGPRT katalysierte Synthese von 1-Oxipurinolribonukleotid, sowie die durch Orotatphosphoribosyl-Transferase katalysierte Bildung von 7-Oxipurinolribonukleotid (3).Diese beiden Ribonukleotidderivate des Oxipurinols dürften gemeinsam mit Allopurinolribonukleotid und Xanthosin-5-monophosphat (XMP) die Hemmung der Pyrimidinsynthese während einer Allopurinolbehandlung verursachen.Im Rahmen dieser Befunde dürfte 7-Oxipurinolribonukleotid der einzige Metabolit sein, der die Pyrimidinsynthese bei mit Allopurinol behandelten Lesch-Nyhan-Patienten hemmt.Ob die Oxipurinolderivate auch zu einer Hemmung der Purinsynthese de novo führen, ist noch ungeklärt.
Der Hemmung der ODC folgt unter kontinuierlicher Verabreichung von Allopurinol innerhalb von ein bis zwei Wochen ein Anstieg der Aktivität von OPRT und ODC (13,1).Die Ursache dieses Enzymanstiegs ist noch nicht vollständig geklärt. Während Fox und Mitarbeiter eine Enzymstabilisierung von Orotatphosphoribosyl-Transferase und ODC annehmen (13), führen Beardmore und Kelley den Anstieg beider Enzymaktivitäten auf eine "Enzymaktivierung im weitesten Sinne" zurück (1).Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, daß der Anstieg beider Enzymaktivitäten auf einer Enzymstabilisierung auf der Basis einer Änderung der Molekülgröße beruht (24).
Die durch Allopurinol induzierte Orotazidurie führt zu Orotsäureausscheidungen von 15-100mg pro die (Normalwert bis 1,4 mg/die), was nur 1 - 5 % der Ausscheidung bei der hereditären Orotazidurie Typ II bedeutet; ansonsten kann sie aber als direkte Phänokopie dieser Stoffwechselkrankheit angesehen werden (68).

C EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1.PROBLEMSTELLUNG

Aufgrund der Erkenntnisse über die Wirkungen des Allopurinols benutzt man dieses heute auch als Testsubstanz für in vivo Untersuchungen bei gesunden Personen,um so nähere Aufschlüsse über die Zusammenhänge und Regulationsarten des Purin-und Pyrimidinstoffwechsels zu gewinnen.Zöllner und Gröbner berichteten 1971 über die Beeinflussung der durch Allopurinol induzierten Orotazidurie durch Ribonukleinsäure (71).Die zusätzliche tägliche Verabreichung von 4g Ribonukleinsäure bewirkte bei gesunden Versuchspersonen,die täglich 400mg Allopurinol einnahmen,innerhalb weniger Tage eine deutliche Abnahme der renalen Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin.Dementsprechend führte die Zulage von Allopurinol bei Personen,die täglich 4g Ribonukleinsäure einnahmen,zu keinem ausgeprägten Anstieg der Orotsäureausscheidung.Eine ähnliche Wirkung wird auch durch Nukleinsäure-Hydrolysat,Uridin-5-monophosphat (UMP),Cytidin-5-monophosphat (CMP) sowie Guanosin-5-monophosphat (GMP) hervorgerufen (70).
Diese Befunde sind mit einer Hemmung der endogenen Pyrimidinsynthese de novo durch RNS beziehungsweise o.g.Nukleotide vereinbar.Damit steht auch die klinische Beobachtung in Einklang,daß bei der hereditären Orotazidurie die Gabe von Uridin zu einer Reduktion der Orotsäureausscheidung führt (5,30).
Es war nun in dieser Arbeit zu untersuchen,wie die drei Substanzen Uridin-5-monophosphat (UMP),Xanthosin-5-monophosphat (XMP) und Hypoxanthin (HX) den Pyrimidinstoffwechsel beeinflussen:
-Das XMP,das in vitro die ODC und damit die Pyrimidinsynthese hemmt,sollte erstmals auf seine Wirksamkeit in vivo untersucht werden und mit dem Einfluß des Allopurinol verglichen werden.

-Das UMP war bereits 1975 Gegenstand einer ähnlichen Testreihe (70);es verminderte die durch Allopurinol induzierte Orotazidurie in einer Dosierung von 1g/die, allerdings geringer im Vergleich zu 4g/die RNS,da keine Äquivalenzdosen verabreicht wurden.Hier wurde es in dreifach höherer Dosierung eingesetzt,zusätzlich sollte seine spezielle Wirkung auf die ODC untersucht werden (s.o.S.20).
-Zur Prüfung des Hypoxanthins (HX) führte die Frage, ob Pyrimidin-und Purinderivate die renale Orotsäureauscheidung in gleicher Weise beeinflussen.
Unter diesen Aspekten war es erforderlich,neben der täglichen Gesamtorotsäureausscheidung die Serumharnsäure,sowie Harnsäure-,Kreatinin- und Oxypurinelimination im Urin zu bestimmen.Ferner sollte die Messung der Aktivitäten von ODC,HGPRT und APRT Einblicke in die Regulation des Purin-und Pyrimidinstoffwechsels verschaffen.

2.METHODIK

2.1.Versuchspersonen

Drei gesunde Versuchspersonen im Alter zwischen 20 und 23 Jahren nahmen an dem Test teil:
-Versuchsperson(VP)"A",Studentin,23 Jahre
-Versuchsperson(VP)"B",Arzthelferin,20 Jahre
-Versuchsperson(VP)"C",Studentin,23 Jahre
Die Versuchspersonen wurden vor Beginn der Untersuchungen ausführlich über die Zusammensetzung der Formeldiät und die einzunehmenden Medikamente sowie Testsubstanzen unterrichtet.Sie wurden über den genauen Ablauf des Versuchs in Kenntnis gesetzt;jede Versuchsperson bekam ein Protokoll,das täglich auszufüllen war und dessen Auswertung es gestattete,eventuelle Fehler bei der Ausführung des Versuchs sofort zu berichtigen.
Vor Beginn des Tests wurden alle drei Versuchs-Personen auf ihren Gesundheitszustand hin gründlich untersucht.Die blutchemischen Analysen,sowie Wiegen und Messen zeigten folgende Ergebnisse:

Versuchspersonen	VP"A"	VP"B"	VP"C"
Gesamt-Bilirubin	0,9mg%	0,4mg%	0,6mg%
Harnstoff-N	10mg%	13mg%	10mg%
Kreatinin	0,8mg%	0,7mg%	0,8mg%
Natrium	145mval/l	144mval/l	143mval/l
Kalium	4,2mval/l	5,2mval/l	4,7mval/l
Calcium	9,0mval/l	9,3mval/l	9,2mval/l
S-GOT	10I.E.	10I.E.	13I.E.
S-GPT	7I.E.	6I.E.	12I.E.
Größe	165cm	165cm	165cm
Gewicht	57kg	60kg	65kg

Abb.13:Untersuchungsergebnisse vor Versuchsbeginn

2.2.Die Formeldiät

Grundbedingung für die Untersuchung der Metaboliten des Purin-und Pyrimidinstoffwechsels ist, daß deren Derivate weder exogen,d.h.beispielsweise mit der Nahrung,zugeführt werden,noch sich die Parameter durch vermehrten Zellaufbau bzw. -abbau in irgend einer Weise verändern.Die Versuchspersonen mußten sich daher über den Zeitraum des Tests sowohl purin-und pyrimidinfrei, als auch isoenergetisch durch eine flüssige Formeldiät ernähren.

a)Zusammensetzung der Diät

Die Grundnahrungsstoffe Eiweiß,Kohlenhydrat und Fett wurden so aufgeteilt,daß sich ein Eiweißanteil von 15%,ein Kohlenhydratanteil von 55% und ein Fettanteil von 30% ergab.

Der Proteinträger der Diät war Magermilchsprühpulver(MMSP) mit einem Eiweißgehalt von 33%,einem Kohlenhydratgehalt von 47%,geringem Fettanteil und einem Wassergehalt von ca.3-5%.

Der eigentliche Kohlenhydratlieferant war Maltodextrin^{R} der Firma Maizena,ein Gemisch von verschiedenen Oligosachariden.Der Kohlenhydratanteil beträgt 94,5%,der Wassergehalt ca.5,5%.

Als Fettfand Livio^{R}-Speiseöl Verwendung,welches einen hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren enthält.

Da das Milchpulver bereits einen hohen Gehalt an Elektrolyten und Mineralien aufweist,wurde jeweils nur noch eine geringe Menge (2 bzw.1,5g) Kochsalz zugeführt,womit der tägliche Bedarf ausreichend abgedeckt war.

Der Vitaminbedarf wurde durch Gabe eines Multivitaminpräparates,hier Multibionta^{R},täglich 2 Kapseln,substituiert.

	Eiweiß	Kohlenhydrat	Fett
MMSP	15%	21,37%	0,78%
Maltodextrin^{R}	---	33,63%	---
Livio^{R}-Öl	---	---	29,22%
total	15%	55%	30%

Abb.14:Prozentuale Zusammensetzung der Formeldiät

Das Eiweiß kam zu 100% aus MMSP,das Fett zu 2,62% aus MMSP und zu 97,38% aus Livio^{R}-Öl und die Kohlenhydrate wurden zu 38,85% aus MMSP und zu 61,15% aus Maltodextrin^{R} gedeckt.

b)Berechnung der Formeldiät
-Berechnung des Kalorienbedarfs:
Zur Berechnung der benötigten Zutaten mußte der tägliche Kalorienbedarf ermittelt werden.Aus Größe und Gewicht wurde anhand der Werte aus dem Normogramm(9) die Körperoberfläche der jeweiligen Versuchspersonen gefunden.Unter Berücksichtigung von Alter und Geschlecht wurde dann nach Angaben von Boothby der Grundumsatz pro Quadratmeter Körperoberfläche und pro Stunde ermittelt. Mittels der Körperoberfläche ließ sich damit der Grundumsatz (kcal) pro Versuchsperson und Stunde errechnen.Hieraus ergab sich anschließend der Tagesgrundumsatz (kcal/24h).Dieser Tagesgrundumsatz wurde durch Multiplikation mit dem Faktor 1,7 auf den Tagesarbeitsumsatz umgerechnet(61). Der Umrechnungsfaktor entspricht leichter Bürotätigkeit und damit ungefähr der Tätigkeit der Versuchspersonen (Studentinnen bzw.Arzthelferin). Der Tagesarbeitsumsatz ist dem Gesamtkalorienbedarf pro Person und Tag gleichzusetzen,der sich daraufhin wie folgt ergab:

VP"A" 2200 kcal/24h
VP"B" 2200 kcal/24h
VP"C" 2500 kcal/24h

Bei dieser Tageskalorienzufuhr hielten die Versuchspersonen ihr Gewicht,das täglich kontrolliert wurde,während des Tests konstant.

-Berechnung der Zutaten in Gramm:
Um die einzelnen Bestandteile der Formeldiät in Gramm genau für jede Versuchsperson zu kennen, wurde zunächst ermittelt,wieviel Gramm an Eiweiß, Kohlenhydrat und Fett pro 100 kcal benötigt werden und diese Menge wurde dann mit dem Gesamtkalorienbedarf bzw.dem Quotienten-Gesamtkalorienbedarf/VP und Tag/100 -multipliziert. Die Menge an Fett in Gramm wurde zusätzlich mit dem Faktor 1,1 multipliziert,um die Fettmenge auch in Millilitern zu erhalten.
Unter Berücksichtigung der Kalorienanteile,Eiweiß 15%,Kohlenhydrate 55%,Fett 30% ergaben sich danach für die Diäten die in Abb.15 folgenden Zusammensetzungen.

- 2200 kcal -

NÄHRSTOFFQUELLE	g(ml)	NÄHRSTOFFE	g ≙ kcal
MMSP 816,64 kcal	244	Eiweiß Kohlenhydrat Fett	80,5 330 114,62 470,14 1,76 16,5
Maltodextrin^{R} 739,86 kcal	189,42	Kohlenhydrat	180,4 739,86
Livio^{R}-Öl 643,5 kcal	68,08 (76,01)	Fett	65,53 643,5
Wasser: 1000 ml NaCl: 2 g Multibionta: tgl.2 Kapseln			

- 2500 kcal -

NÄHRSTOFFQUELLE	g(ml)	NÄHRSTOFFE	g ≙ kcal
MMSP 928,0 kcal	277,3	Eiweiß Kohlenhydrat Fett	91,5 375 103,3 534,3 2,0 18,7
Maltodextrin^{R} 840,7 kcal	215,3	Kohlenhydrat	205,0 840,7
Livio^{R}-Öl 731,3	78,5 (86,35)	Fett	74,0 731,3
Wasser: 1000 ml NaCl: 1,5 g Multibionta: tgl.2 Kapseln			

Abb.15: Zusammensetzung der Formeldiät in Gramm und kcal

c)Zubereitung der Formeldiät
Die für die einzelnen Versuchspersonen errechnete Menge an MMSP und Maltodextrin^{R} wurde auf einer Analysenwaage genau abgewogen und mit dem Livio^{R}-Öl,das in ml gemessen wurde,in einer Rührmaschine mit jeweils 1000ml Wasser zu einem homogenen Brei vermengt.Diese Masse wurde anschließend, auf vier gleichmäßige Portionen verteilt,in paraffinierte Milchtüten gefüllt.Die Versuchspersonen nahmen diese vier Mahlzeiten,in regelmäßigen Abständen über den Tag verteilt,zu sich.

2.3.Die Testsubstanzen
-Zyloric^{R}
Allopurinol
Fa.Wellcome
-UMP;Uridin-5-monophosphat
kristall.di-Natriumsalz
Fa.Boehringer & Söhne Mannheim
-XMP;Xanthosin-5-monophosphat
kristall.di-Natriumsalz
Fa.Serva-International Heidelberg
-Hypoxanthin
Art.4517
Fa.E.Merck Darmstadt

Auch die Testsubstanzen wurden auf vier Portionen verteilt zu den Mahlzeiten eingenommen.Vom Zyloric^{R} wurden dazu viermal täglich eine Kapsel zu 100mg (Originalform),also ingesamt 400mg/die, verabreicht.Die übrigen Testsubstanzen,UMP,XMP und Hypoxanthin wurden in Tagesportionen von jeweils 3g verteilt.Die kristallisierten Verbindungen wurden hierzu auf einer Analysenwaage genau abgemessen und in Obladenkapseln gefüllt.

2.4. Versuchsablauf und Versuchsanordnung

a) Versuchsablauf

Während des Versuchs sollte täglich die Orotsäure-, Oxypurin-, Harnsäure- und Kreatininausscheidung im Urin bestimmt werden. Hierzu mußten die Versuchspersonen während der gesamten Zeit jeweils ihren 24-Std.-Urin sammeln. Dieser wurde in 1l-Flaschen aufgefangen, die 10ml Toluol enthielten, um etwaiges Bakterienwachstum zu hemmen. Die 24h-Urinmenge wurde täglich gemessen, gut durchgemischt und bis auf die für die Analysen benötigte Menge verworfen. Der Analysenurin wurde in Glasfläschchen gefüllt und eingefroren. Später wurde er dann vor jeder Analyse neu im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und filtriert.

Für die Messung der Serumharnsäure sowie der Aktivitäten der ODC, HGPRT und APRT wurde den Versuchspersonen jeden zweiten Tag morgens Nüchternblut abgenommen. Diese Proben (ca. 10ml venöses Blut mit 2 Tropfen Heparin, Trombophob^{R}) wurden sofort 20min lang bei 2000U/min zentrifugiert. Anschließend konnte mit einer Pasteur-Pipette das Plasma abgesaugt werden, das dann bis zur weiteren Verwendung (Serumharnsäure-Bestimmung) ebenfalls eingefroren wurde.

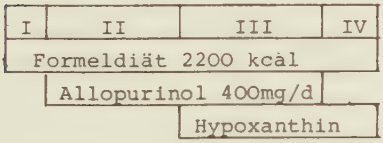
Die verbleibenden Erythrocyten sollten für die restlichen Bestimmungen hämolysiert werden. Hierzu wurden sie zweimal mit vorgekühlter NaCl-Lösung gewaschen, 20min zentrifugiert (2000U/min), der Überstand abgesaugt und verworfen. Danach wurden die gewaschenen roten Blutkörperchen durch zweimaliges Einfrieren und Wiederauftauen hämolysiert.

Zur Durchführung der Enzymanalysen mußten die hämolysierten Erythrocyten noch dialysiert werden.Ein Dialyseschlauch wurde in 500ml destilliertem Wasser mit 0,6mM EDTA eine Stunde lang zur Entfernung von Mg-Ionen gekocht.Zur Dialyse wurde das Hämolysat dann in den Dialyseschlauch gegossen,in ein großes Gefäß mit o,oo1M Tris-Puffer und einem Magnetrührer gehängt und unter ständigem Rühren zwei Stunden lang in eine Kältekammer bei 4°C gestellt.

b)Versuchsanordnung

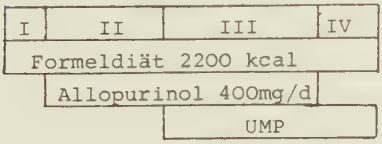
-Versuchsperson"A" testete Allopurinol und Hypoxanthin:

Nach der 3tägigen Beobachtungszeit unter Formeldiät allein (I) erhielt VP"A" zehn Tage lang Allopurinol 400mg/die (II).Anschließend wurde für weitere zehn Tage Hypoxanthin 3g/die zugelegt (III).Schließlich wurde Allopurinol abgesetzt und fünf Tage lang nur noch Hypoxanthin 3g/die gegeben (IV).

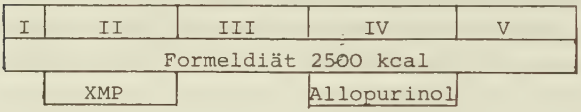


-Versuchsperson"B" testete Allopurinol und UMP:

Ebenfalls nach drei Tagen (I) bekam VP"B" zehn Tage lang Allopurinol 400mg/die (II),dann zusätzlich zehn Tage lang UMP 3g/die (III).Während der letzten fünf Tage erhielt VP"B" nur noch UMP 3g/die (IV).



-Versuchsperson"C" testete XMP und Allopurinol: VP"C" bekam nach der dreitägigen Beobachtungszeit (I)fünf Tage lang XMP 3g/die zugelegt (II). Nach weiteren fünf Tagen unter Formeldiät allein (III) wurde sie noch fünf Tage unter Allopurinol 400mg/die gesetzt (IV) und danach wieder unter Formeldiät allein beobachtet (V).



2.5.Analysen

Aus den Proben der jeweils gesammelten 24Std.-Urinmengen wurden Harnsäure,Hypoxanthin und Xanthin enzymatisch bestimmt,Orotsäure und Kreatinin mit colorimetrischen Tests.
Die Serumharnsäure wurde ebenfalls enzymatisch ermittelt.
Die Bestimmung der Aktivitäten der Enzyme ODC, HGPRT und APRT in den Erythrocyten erfolgte mikroradiochemisch.

Alle Analysen wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt.Zur Überprüfung der genauen Durchführung der Methoden wurden jeweils vor dem Ansatz der Analysenreihen Eichkurven erstellt.

2.5.1. Bestimmung der Harnsäure (69)

Prinzip:

Durch die Einwirkung von Uricase wird Harnsäure in Allantoin umgewandelt.Gleichzeitig verschwindet die typische Absorptionsbande bei 293nm.Dieser Extinktionsabfall beträgt bei Verwendung des angegebenen Glycinpuffers 0,0745 für eine Harnsäurekonzentration von 1µg/ml und eine Schichtdicke der Küvetten von 1 cm.

Reagentien:

-Glycin-Puffer 0,66M,pH 9,3

-Uricase Loewens

-Aqua bidest.

-Harnsäure Merck

--Glycin-Puffer-Gebrauchslösung:Von dem kühl gestellten und mit Chloroform haltbar gemachten Glycin-Puffer wird die jeweils für eine Analysenreihe benötigte Menge Gebrauchslösung durch 1:10 Verdünnen hergestellt.

--Uricase-Gebrauchslösung:Der Inhalt einer Ampulle Uricase wird in 0,25ml der Puffer-Gebrauchslösung aufgelöst.Vor jeder Bestimmung wird eine entsprechende Menge dieser Lösung mit Puffer-Gebrauchslösung 1:10C verdünnt.Die Eigenextinktion dieser Lösung sollte unter den gegebenen Bedingungen zwischen 0,010 und 0,015 liegen.

Durchführung:

Serum-Verdünnung: 1ml Serum wird auf 25ml Puffer-Gebrauchslösung verdünnt.

Urin-Verdünnung: 0,2ml Urin,der vorher gut aufgeschüttelt werden muß,da eventuell Urate bereits ausgefallen sind,werden auf 25ml Puffer-Gebrauchslösung verdünnt.

Für die Photometrie werden folgende Ansätze hergestellt:

I.Zur Bestimmung der Eigenextinktion der Uricase

I.1. 2ml Puffer-Gebrauchslösung;1ml Uricase-Gebrauchslösung

I.2. 3ml Puffer-Gebrauchslösung

II.Zur Bestimmung des Extinktionsabfalls in Serum und Urin (E_{HS})

II.3. 2ml verd.Serum bzw.Urin;1ml Puffer-Gebrauchslösung

II.4. 2ml verd.Serum bzw.Urin;1ml Uricase-Gebrauchslösung

Alle Ansätze werden gut durchgeschüttelt und bei Zimmertemperatur 40min lang stehengelassen.

Durchführung der Photometrie am Spektralphotometer bei Wellenlänge 293nm mit Quarzküvetten von 1cm Schichtdicke:

Zur Bestimmung der Eigenextinktion der Uricase wird I.1. gegen I.2. als Nullwert abgelesen. Bei den Serum- bzw.Urinansätzen dient II.4. als Nullwert für die Ablesung von II.3..Die Ablesung dieser Ansätze wird in einer Stichprobe nach 5min wiederholt,um festzustellen, ob die Uricase-Reaktion abgeschlossen ist. Die Extinktion darf sich in diesem Intervall nicht geändert haben.

Die Extinktionsdifferenz dieser Ablesung ist die Eigenextinktion der Uricase (E_U) zuzuzählen,da nicht berücksichtigt ist,daß nur einem der Ansätze Uricase zugesetzt wird;Die Harnsäurekonzentration ist also proportional $E_U + E_{HS}$.Da der Extinktionskoeffizient für eine Lösung von 1µg/ml in der 1cm-Küvette 0,0745 beträgt,ist die Konzentration im Versuchsansatz gleich:

$$\frac{E_U + E_{HS}}{0{,}0745} = \mu g/ml$$

Unter Berücksichtigung der Verdünnungen berechnet sich daraus die Harnsäurekonzentration

-im Serum zu $\frac{(E_U + E_{HS}) \cdot 3 \cdot 25 \cdot 100}{0{,}0745 \cdot 2 \cdot 1000} =$

$$\frac{(E_U + E_{HS}) \cdot 100}{2} =$$

$$(E_U + E_{HS}) \cdot 50 \text{ mg\%}$$

-im Urin zu $\frac{(E_U + E_{HS}) \cdot 3 \cdot 125 \cdot 100}{0{,}0745 \cdot 2 \cdot 1000} =$

$$\frac{(E_U + E_{HS}) \cdot 500}{2} =$$

$$(E_U + E_{HS}) \cdot 250 \text{ mg\%}$$

Eichkurve:
Herstellung einer 8mg% Harnsäurelösung,pH 7-8. Davon werden Ansätze mit 0,2-0,4-0,6-0,8-1,0ml auf 25ml Puffer-Gebrauchslösung verdünnt.Im weiteren verfährt man wie bei den Bestimmungen von Serum- und Urinharnsäure.

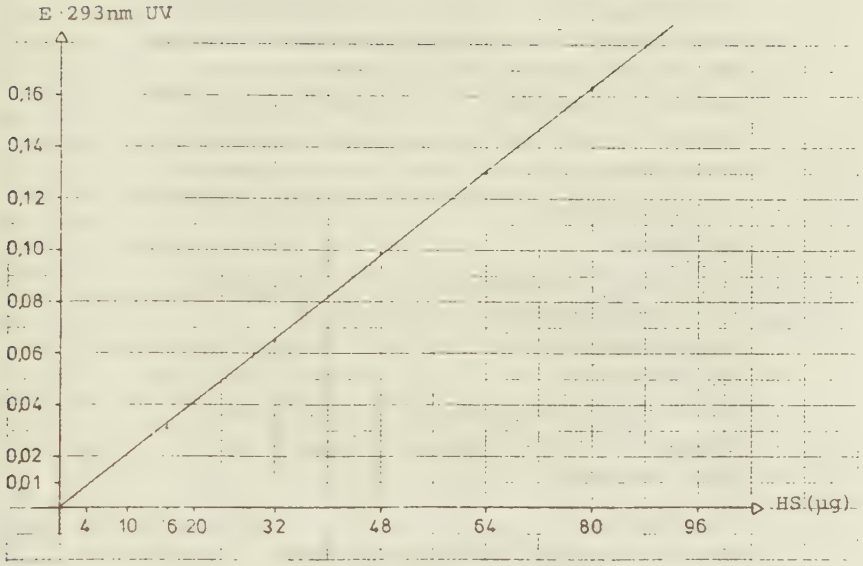


Abb.16: Eichkurve zur Harnsäurebestimmung

E_U = Eigenextinktion der Uricase = 0,028

Glas	E(HS)	E(U)+E(HS)	HS(µg)
1	0,003	0,031	16
2	0,037	0,065	32
3	0,071	0,099	48
4	0,102	0,130	64
5	0,135	0,163	80

2.5.2. Bestimmung des Kreatinins (52)

Prinzip:

Kreatinin reduziert eine alkalische Pikrinsäurelösung zu Pikraminsäure-Reduktion einer NO_2-Gruppe zu einer NH_2-Gruppe-,wobei ein gelb- bis braunroter Farbkomplex auftritt. Dessen Farbintensität ist der Kreatinin-Konzentration proportional und kann bei 520nm spektralphotometrisch bestimmt werden.

Reagentien:

Biochemica-Testkombination (Fa.Boehringer)

-1mg% Kreatinin-Lösung = Standard

-Trichloressigsäure 1,2n

-Aqua bidest.

Reaktionsgemisch:Hergestellt durch eine Mischung 1:1 aus 17,5mM Pikrinsäure und 0,8n Natronlauge

Durchführung:

Urin-Verdünnung 1:50 mit Aqua bidest.

Für die Photometrie werden folgende Ansätze bereitet:

I. 0,5ml Aqua bidest.;0,5ml Trichloressigsäure; 1,0ml Reaktionsgemisch;dieser Ansatz ergibt den Leerwert, mit dem das Photometer bei 520nm abgeglichen wird.

II. 0,5ml Standard;0,5ml Trichloressigsäure; 1,0ml Reaktionsgemisch;am Photometer abgelesen ergibt dies die Eigenextinktion der 1mg% Kreatinin-Lsg. = $E_{STANDARD}$

III. 0,5ml verd.Urin;0,5ml Trichloressigsäure;1,0ml Reaktionsgemisch; = E_{PROBE}

Berechnung:

-für die Konzentration(c) des Kreatinins im Urin

$$c = 50 \cdot \frac{E_{PROBE}}{E_{STANDARD}} \text{ mg/100ml}$$

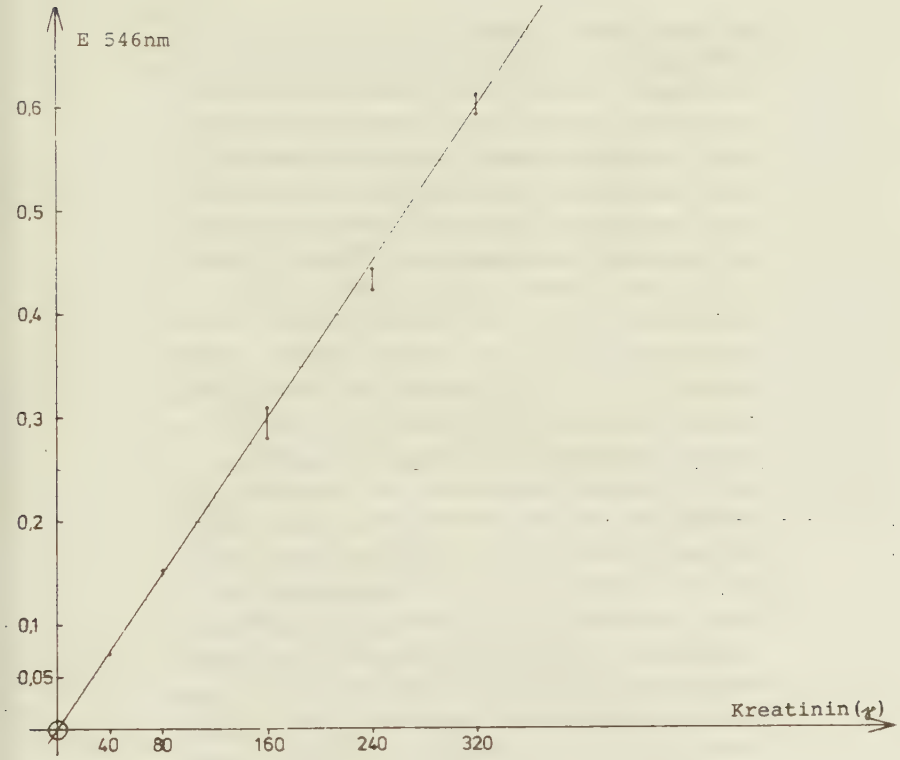


Abb.17: Eichkurve zur Kreatininbestimmung

Glas	E	E'	Kreatinin (γ)
1	0,073	0,072	40
2	0,150	0,154	80
3	0,280	0,308	160
4	0,446	0,426	240
5	0,616	0,594	320

2.5.3.Bestimmung der Orotsäure (54)

Prinzip:

Orotsäure reagiert mit Bromwasser zu 5-5'di-Brom-Barbitursäure.Diese wird durch Ascorbinsäure zu Barbitursäure reduziert.Barbitursäure bildet mit p-Dimethyl-Aminobenzaldehyd (Ehrlichs Reagens) einen gelben Farbkomplex, der bei 480nm eine maximale optische Dichte hat und der Orotsäurekonzentration proportional ist.

Zu berücksichtigen ist aber,daß andere Urinbestandteile (z.B.Tryptophan,Histidin,Riboflavin) Farbkomplexe bilden,die zwar ein Absorptionsmaximum bei 412nm haben,aber auch im Absorptionsmaximum der Orotsäure (480nm) ein Plateau bilden,das mit der Orotsäureextinktion interferiert und somit bei der Bestimmung eine verfälschte Orotsäuremenge ergäbe.Um diese Interferenz auszuschalten,wurde in Testreihen ein Erfahrungswert gefunden,der als Korrekturfaktor in die Orotsäureberechnung eingeht,und die tatsächliche Orotsäuremenge wiedergibt:

$E = E_{480} - E_{412}/3$

Reagentien:

-Orotsäure Schuchardt

-K^+-Citratpuffer 0,2M,pH 2,5

-Bromwasser gesättigt

-5% Ascorbinsäure,in Puffer gelöst

-Ehrlichs Reagens (p-dimethyl-Aminobenzaldehyd in Phenol)

Durchführung:

Für die spätere Berechnung der Orotsäurekonzentrationen ist eine Eichkurve nötig.Hierzu stellt man eine 8mg% Orotsäurelösung,pH8 her.

Glas	Puffer	3mg%-Lsg.	Aqua bidest	Orotsäure
1	2,5ml	0,5ml	-	40µg
2	2,5ml	0,4ml	0,1ml	32µg
3	2,5ml	0,3ml	0,2ml	24µg
4	2,5ml	0,2ml	0,3ml	16µg
5	2,5ml	0,1ml	0,4ml	8µg
6	2,5ml	0,05ml	0,45ml	4µg

Abb.17: Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Orotsäure

Weiterhin verfährt man mit den Eichlösungen genauso wie mit den Urinproben.
In Zentrifugengläser werden der Reihe nach pipettiert:
-0,5ml Urin
-2,5ml K^+-Citratpuffer
-0,5ml Bromwasser
-nach 1min: 1,0ml Ascorbinsäure
-nach 2min: 2,0ml Ehrlichs Reagens
Nach jeder Reagentienzugabe wird gemischt und nach 90min am Spektralphotometer bei 480nm und bei 412nm die Extinktion abgelesen.

Berechnung:

$$E = E_{480} - E_{412}/3$$

Diese Extinktion (E) wird an der Eichkurve aufgesucht und die Konzentration (c) entspricht dann der in der 0,5ml-Urinprobe enthaltenen Orotsäuremenge.Diese muß noch anhand der 24h-Urinmenge auf die Tagesausscheidung umgerechnet werden.

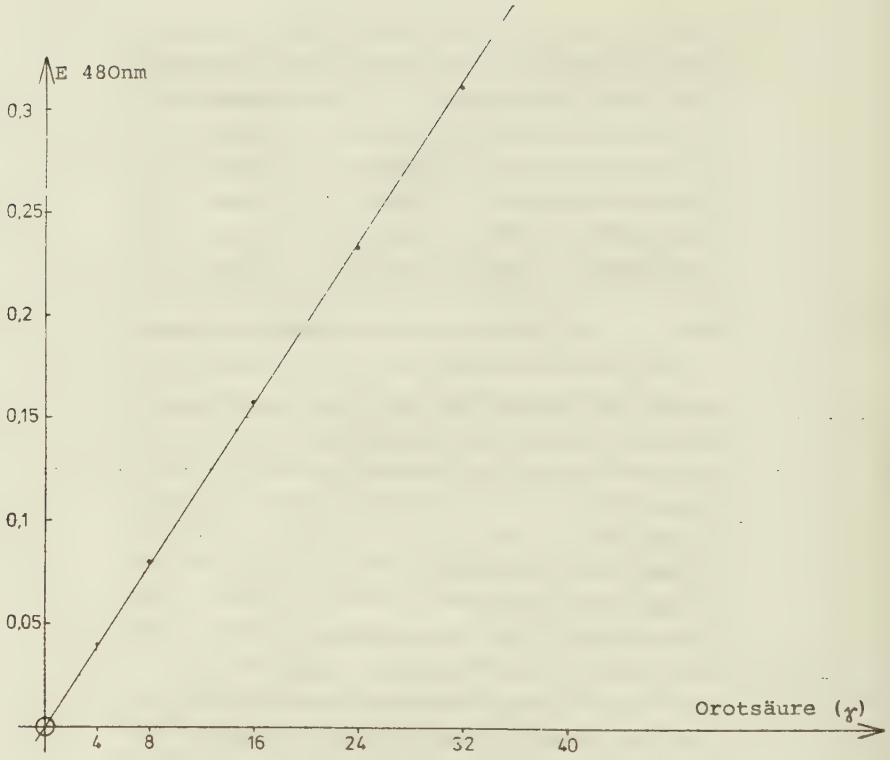


Abb.18: Eichkurve zur Orotsäurebestimmung

Glas	E	E'	Orotsäure (γ)
1	0,357	0,362	40
2	0,307	0,312	32
3	0,233	0,232	24
4	0,158	0,157	16
5	0,079	0,080	8
6	0,037	0,043	4

2.5.4. Bestimmung der Oxypurine (40)

Prinzip:

Die Oxypurine Xanthin und Hypoxanthin werden indirekt gemessen. Sie werden durch die Xanthinoxydase zu Harnsäure umgewandelt. Diese wird mit Uricase zu Allantoin umgesetzt. Da das Allantoin bei 293nm (Absorptionsmaximum der Harnsäure) nicht mehr absorbiert, kann wieder aus der Extinktionsdifferenz vor und nach Zugabe der Uricase die Harnsäurekonzentration nach Lambert-Beer berechnet werden. Die Harnsäurekonzentration im unbehandelten Urin und nach Zugabe der Xanthinoxydase differiert dann um den Betrag der abgebauten Oxypurine, deren Ausscheidung sich danach berechnen läßt.

Reagentien:

-Hypoxanthin Fa.Serva
-Harnsäure Fa.Merck
-Glycinpuffer 0.66M, pH 9,3
-Uricase Fa.Loewens
-Xanthinoxydase Fa.Boehringer
-Aqua bidest.
-Glycinpuffer-Gebrauchslösung: Von dem Glycinpuffer wird die jeweils für eine Analysenreihe benötigte Menge Gebrauchslösung durch 1:10 Verdünnen mit Aqua bidest. frisch hergestellt.
-Uricase-Gebrauchslösung: 1 Ampulle Uricase wird in 1ml Puffer-Gebrauchslösung gelöst.
-Urin-Verdünnung: 0,5ml Urin werden auf 25ml Puffer-Gebrauchslösung 1:50 verdünnt.

Durchführung:
Für die Photometrie bei 293nm werden folgende Ansätze hergestellt:

I. Eigenextinktion der Uricase
3ml Puffer-Gebrauchslsg.;0,05ml Uricase-Lsg.

II. Eigenextinktion der Xanthinoxydase
3ml Puffer-Gebrauchslsg.;0,02ml Xanthinoxydase

III. Eigenextinktion von Uricase und Xanthinoxydase
3ml Puffer-Gebrauchslsg.;0,05ml Uricase
und 0,02ml Xanthinoxydase

A) Extinktion der Urin-Harnsäure
(ohne Harnsäure aus den Oxypurinen)
ablesen sofort (0min)
2ml Puffer-Gebrauchslsg.;1ml Urinverdünnung

B) Extinktion der Gesamt-Harnsäure
(durch Zugabe von Xanthinoxydase zusätzlich Oxypurin-Harnsäure);ablesen 20min nach Enzymzugabe
2ml Puffer-Gebrauchslsg.;1ml Urinverdünnung;
0,02ml Xanthinoxydase;

C) Extinktion nach Umwandlung der Urin-Harnsäure in Allantoin (durch Zugabe von Uricase);
ablesen 45min nach Enzymzugabe
2ml Puffer-Gebrauchslsg.;1ml Urinverdünnung;
0,05ml Uricase;

D) Extinktion nach Umwandlung der Gesamt-Harnsäure in Allantoin (durch Zugabe von Xanthinoxydase und Uricase);
ablesen 20 und 45min nach Enzymzugabe
2ml Puffer-Gebrauchslsg.;1ml Urinverdünnung;
0,02ml Xanthinoxydase;0,05ml Uricase;

Berechnung:

1. Ext.-Differenz B-D = Extinktion der Gesamt-Harnsäure = $\Delta E_{GES.-HS}$

2. Ext.-Differenz A-C = Extinktion der Urin-Harnsäure = $\Delta E_{U.-HS}$

3. Ext.-Differenz (B-D) - (A-C) = Extinktion der aus den Oxypurinen stammenden Harnsäure = ΔE_{OP-HS}

Zur Oxypurinberechnung können die Enzymeigenextinktionen von Uricase und Xanthinoxydase vernachlässigt werden,da sie sich aufheben.Bei der Berechnung der Urin-Harnsäure muß jedoch die Eigenextinktion der Uricase berücksichtigt werden.
Unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren errechnen sich die Konzentrationen der Oxypurine wie folgt:

$$c = \frac{\Delta E_{OP\ HS}}{0,0745} \cdot 3,07 \cdot 50 \cdot 0,81\ \frac{\mu g}{ml}$$

-Faktor 0,0745 ist der Extinktionsabfall für eine Harnsäurekonzentration von 1µg/ml bei Verwendung des angegebenen Glycin-Puffers und Küvetten von 1cm Schichtdicke.
-Faktor 0,81 dient der Umrechnung von Harnsäure (MG 168) auf Hypoxanthin (MG 136). Das Ergebnis gibt somit die Gesamtausscheidung von Hypoxanthin und Xanthin nur als Hypoxanthin an.Der geringe Fehler durch das etwas höhere Molekulargewicht von Xanthin wird in Kauf genommen.

Eichkurve:
Aus einer 5mg% Harnsäurelösung,pH 7-8,und einer 5mg% Hypoxanthinlösung,pH 8,wird folgende Verdünnungsreihe hergestellt:In fünf Reagensgläser werden 1,2,3,4 und 5ml von beiden Eichlösungen pipettiert und diese werden analog den Urinproben verarbeitet.

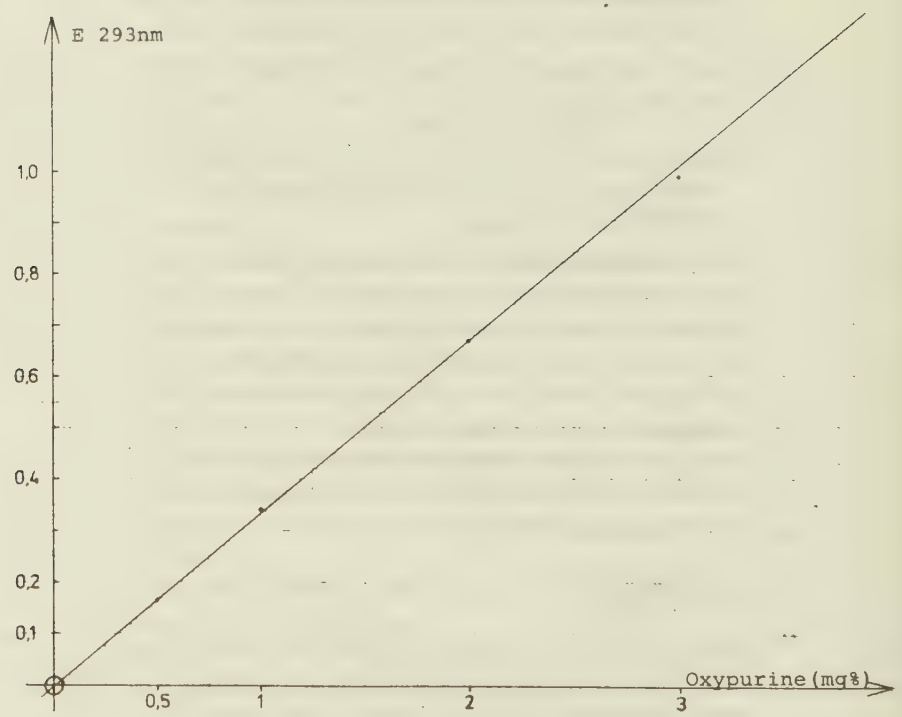


Abb.19: Eichkurve zur Bestimmung der Oxypurine

Glas	E	E'	Oxypurine (mg%)
1	0,163	0,165	0,5
2	0,331	0,352	1
3	0,667	0,672	2
4	0,970	0,996	3

2.5.5. Bestimmung des Eiweißgehaltes(48)

Parallel zu den Bestimmungen der Enzymaktivitäten der ODC,HGPRT und APRT mußte jeweils der Proteinanteil in den Erythrocyten-Dialysaten gemessen werden,da die Enzymaktivitäten in der späteren Berechnung auf 1mg Protein bezogen werden.

Prinzip:
Eiweiß geht in alkalischem Medium mit Kupfer-Ionen eine sogenannte Biuret-Reaktion ein,es bildet sich ein Farbkomplex,der bei 498nm maximal absorbiert.

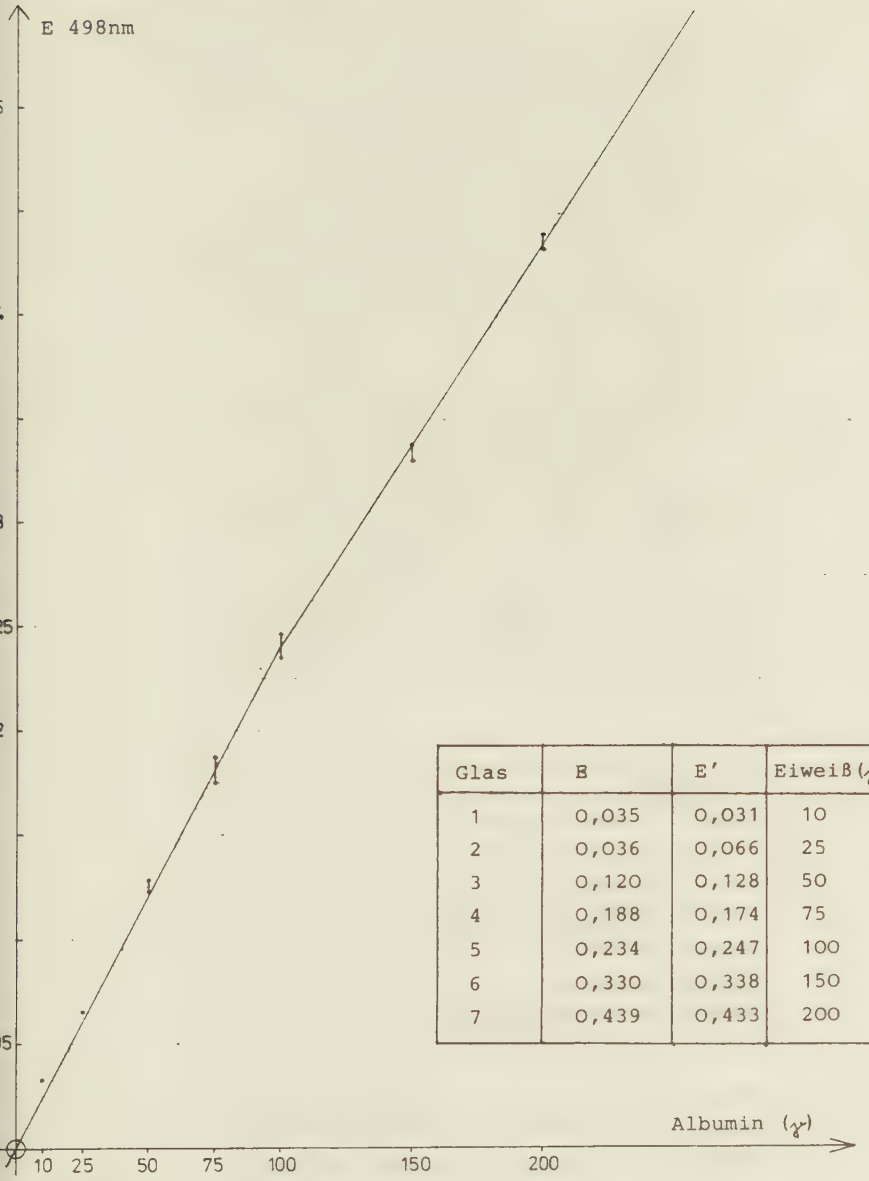
Reagentien:
-2%Na-carbonatlösung in 0,1N NaOH
-0,5% Cu-Sulfat·$5H_2O$ in 1% K-Na-Tartrat
-Reaktionsgemisch hergestellt aus einer Mischung von 1ml Cu-Sulfat und 50ml Na-carbonat
-Folin-Ciocalteus-Phenolreagenswasser (1:1)
-Physiologische NaCl-Lösung
-100mg% Rinderserum-Albuminlösung = Standard für die Eichkurve

Durchführung:
Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der ODC wird das Erythrocyten-Dialysat mit 0,01M K^+-Phosphatpuffer,pH 7,4 1:20 verdünnt.Hiervon werden 10µl ad 0,2ml mit phys.NaCl-Lösung aufgefüllt.
Für die Bestimmung von HGPRT und APRT wird das Dialysat mit demselben Puffer 1:50 verdünnt und für die Eiweißmessung davon 20µl ad 0,2ml mit phys. NaCl-Lösung aufgefüllt.
Zu den Proben bzw.Eichlösungen gibt man 2ml Reaktionsgemisch und läßt den Ansatz 10min bei Zimmertemperatur stehen.Danach wird 0,2ml Folin-Ciocalteus-Reagens rasch zugesetzt.Die Extinktion des Farbkomplexes kann dann nach 30min am Photometer bei 498nm abgelesen werden.

Berechnung:
Unter Berücksichtigung der Verdünnungen kann aus der Eichkurve die der jeweiligen Extinktion entsprechende Eiweißkonzentration entnommen werden.

Eichkurve:
Herstellung einer Verdünnungsreihe aus der 100mg% Standardlösung

Glas	Standard	phys.NaCl	Eiweiß(%)
1	0,01ml	0,19ml	10
2	0,02ml	0,18ml	20
3	0,05ml	0,15ml	50
4	0,10ml	0,1oml	100
5	0,15ml	0,05ml	150
6	0,20ml	-	200



Glas	E	E'	Eiweiß (γ)
1	0,035	0,031	10
2	0,036	0,066	25
3	0,120	0,128	50
4	0,188	0,174	75
5	0,234	0,247	100
6	0,330	0,338	150
7	0,439	0,433	200

Abb.20: Eichkurve zur Eiweißbestimmung

2.5.6. Bestimmung der spezifischen Aktivität der Orotidyl-Decarboxylase (36)

Prinzip:

Orotidin-5-monophosphat wird durch die Orotidyl-Decarboxylase(ODC) zu Uridin-5-monophosphat(UMP) umgewandelt;dabei wird pro umgewandeltem Molekül OMP ein Molekül CO_2 abgespalten.Die Reaktion kann durch Veränderung des pH-Wertes,hier durch Zugabe von Perchlorsäure gestoppt werden. Diese Perchlorsäure dient hier auch zur Austreibung des CO_2 aus der Lösung.Bei dieser Methode wird radioaktiv markiertes OMP-7-^{14}C im Überschuß zugegeben,es ist also dasjenige Kohlenstoffatom markiert, das bei der Reaktion in Form von CO_2 frei wird.Dieses radioaktive CO_2 wird aufgefangen in Hyamin-Hydroxid und anschließend wird die der Enzymaktivität entsprechende Radioaktivität in einem Szintillationszähler gemessen.

Reagentien:

-OMP-7-^{14}C,New England Nuclear;
0,52mM Stammlösung,spezifische Aktivität 20-40 m Ci/mmol
-0,01 M K^+-Phosphatpuffer,pH 7,4
-Hyamin-Hydroxid
-Perchlorsäure 4,0 M
-Szintillationsflüssigkeit:
4l Toluol;15,12gPPO;312,4mg POPOP;

Durchführung:

Hämolysat-Verdünnung: 1:10 mit Puffer
Isotopen-Verdünnung: 1:20 mit Puffer

50µl verdünntes Hämolysat und 50µl verdünntes OMP-7-^{14}C werden in ein Reagensglas pipettiert,das sofort durch einen Gummistopfen verschlossen werden muß,damit kein CO_2 entweichen kann.An der Unterseite des Gummistopfens hängt ein Plastikkölbchen mit 0,2ml Hyamin-Hydroxid, das das freiwerdende CO_2 bindet.Dieses Reaktionsgemisch wird 15min bei 37°C geschüttelt.Danach kommt der Ansatz ins Eisbad und die Reaktion wird durch Injektion von ca.0,1-0,2ml Perchlorsäure gestoppt. (Injektion mit Kanüle durch den Gummistopfen).Die Inkubationszeit von 15min muß dabei für jede Probe exakt eingehalten werden.Nach der Zugabe der Perchlorsäure wird der Ansatz nochmals eine Stunde bei 37°C inkubiert,dann werden die Plastikkölbchen abgenommen,trockengewischt und in Zählgläschen mit 10ml Szintillationsflüssigkeit gegeben.Bei der anschließenden Zählung der Counts/min ist die Effizienz des Szintillators zu beachten und bei der Berechnung miteinzubeziehen; die Zählausbeute betrug für die ODC-Bestimmung 95%.

Berechnung der Enzymaktivität:
Ein Beispiel: Die Messung von Probe x ergab 890cpm,der Proteingehalt betrug 494,5γ.

$1\mu Ci \mathrel{\hat{=}} 2{,}22 \cdot 10^6$ dpm

1µmol OMP-7-^{14}C $\mathrel{\hat{=}}$ 39,3µCi (=spez.Aktivität)

$1\mu mol \mathrel{\hat{=}} 2{,}22 \cdot 10^6 \cdot 39{,}3 \cdot 0{,}95$ cpm

$= 69{,}9 \cdot 10^6$ cpm

$$x = \frac{890}{69{,}9 \cdot 10^6} = 12{,}8 \cdot 10^{-6}\ \mu mol$$

$x = 12{,}8 \cdot 10^{-3} \cdot 4$ nmol (bezogen auf 1Std.)

x = 0,051 nmol/Std.

494,5 γ ≙ 0,051 nmol/Std.
1000 γ ≙ 0,103 nmol/Std.

Ergebnis: 0,103 nmol/Std./mg Protein =
spezifische Aktivität der ODC

Eichkurven:

a) Zeitkurve: hier wurde die Reaktion nach o,5,10,15 und 20min gestoppt.

b) Enzymkonzentrationskurve: Es wurden 10, 20,30,40 und 50µl Hämolysat jeweils mit Puffer auf 50µl aufgefüllt, diese unterschiedlichen Verdünnungen wurden behandelt wie oben beschrieben.

Die Eichkurven waren sowohl in Beziehung zur Zeit als auch zur Proteinkonzentration linear.

2.5.7. Bestimmung der spezifischen Aktivität der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (8)

Prinzip:
Die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Tansferase (HGPRT) katalysiert in Gegenwart von PrPP und Mg^{++}-Ionen die Umwandlung von Hypoxanthin (HX) zu Inosin-5-monophosphat (IMP) und von Guanin zu Guanosin-5-monophosphat (GMP).
Bei dieser Methode wird HX-^{14}C im Überschuß zugesetzt,das dann von der in dem Hämolysat enthaltenen HGPRT zu IMP-^{14}C umgebaut wird.Das so entstandene IMP-^{14}C läßt sich von dem nicht umgesetzten HX-^{14}C mittels Hochspannungs-Elektrophorese trennen.Die im Szintillationszähler gemessene Radioaktivität entspricht der Enzymaktivität.

Reagentien:
-A: 1 Teil 0,1M $MgCl_2$
2 Teile 0,5M Tris-HCl,pH 7,4
2 Teile Aqua bidest.
-B: 10mM PrPP
(4mg PrPP in 0,852ml 0,01M Tris-HCl,pH 7,4)
-C: Hypoxanthin-^{14}C
Die HX-^{14}C-Lösung war 2mM,spez.Aktivität 50,4mCi/mmol;diese Stammlösung wird 1:10 mit äquimolarer unmarkierter HX-Lösung verdünnt,dies ergibt eine spezifische Aktivität von 5,04mCi/mmol.
Aus diesen drei Reagentien wird die Substratlösung hergestellt:
- 5 Teile A = 25µl
- 2 Teile B = 10µl
- 3 Teile C = 15µl

-0,1M EDTA
-IMP-Lösung 2mg/ml als Trägersubstanz für die Elektrophorese.

Durchführung:
Hämolysat-Verdünnung: 1:50 (50µl Hämolysat mit 2,45ml 0,01M Tris-HCl)
50µl dieser Hämolysat-Verdünnung werden mit 50µl Substratlösung in Reagensgläser pipettiert,die auf Eis stehen sollen.Die Reaktion läuft ab,sobald der Ansatz bei 37° inkubiert wird.Nach 20min wird die Reaktion durch Zugabe von 20µl 0,1M EDTA,das die zur Katalyse benötigten Mg^{++}-Ionen abfängt,gestoppt.Außerdem wird der Ansatz wieder auf Eis gestellt.
Die Elektrophorese wird folgendermaßen vorbereitet:Das Elpho-Papier(nr.2043b)wird in Stücke von 102cm Länge geschnitten und in Borat-Puffer,pH8,5 (18,1g Na-Borat,3,16g Borsäure,1,5g EDTA ad 4l H_2O) getränkt.
Eine quer über das Papier gezogene Startlinie wird in gleichmäßigen Abständen markiert.An diesen Markierungspunkten werden jeweils 20µl IMP-Trägersubstanz aufgetragen, und,nachdem diese getrocknet sind,auf dieselben Stellen nochmals 20µl des Inkubationsgemisches.Nachdem auch diese getrocknet sind, wird das Papier in die Elektrophorese-Kammer eingespannt und zwar mit der Startlinie zur Kathode.Die Hochspannungs-Elektrophorese läuft 20min unter 4000 Volt.
Das Prinzip der Trennung besteht darin,daß die IMP-Trägersubstanz zusammen mit dem gebildeten IMP-^{14}C von der Kathode zu Anode läuft,während das HX-^{14}C an der Auftragungsstelle zurückbleibt.Auf dem getrockneten Elpho-Papier kann man anschließend die IMP-Bande unter UV-Licht erkennen und ausschneiden.Die Papierstücke werden sodann in Szintillationsflüssigkeit (10ml) gegeben und die Radioaktivität im Packard-Zähler ermittelt.Die Zählausbeute betrug für diese Bestimmung 60%.

Berechnung der Enzymaktivität:
Ein Beispiel:Die Probe x enthielt nach einer Inkubationszeit von 20min 12089cpm,der Proteingehalt betrug 41,6γ.

$1\mu Ci \mathrel{\hat{=}} 2{,}22 \cdot 10^6$ dpm

$1\mu mol\ HX\text{-}{}^{14}C \mathrel{\hat{=}} 50{,}4\ \mu Ci$

$1\mu mol \mathrel{\hat{=}} 2{,}22 \cdot 10^6 \cdot 50{,}4 \cdot 0{,}6$ cpm

$\mathrel{\hat{=}} 67{,}1 \cdot 10^6$ cpm

$$x = \frac{12089}{67{,}1 \cdot 10^6} = 180{,}16 \cdot 10^{-6}\ \mu mol$$

$x = 180{,}16 \cdot 10^{-3} \cdot 3$ nmol (bezogen auf 1Std.)

$x = 540{,}5 \cdot 10^{-3}$ nmol/Std.

$41{,}6\gamma \mathrel{\hat{=}} 540{,}5 \cdot 10^{-3}$ nmol/Std.

$1000\gamma \mathrel{\hat{=}} 12{,}9$ nmol/Std. (Isotop 1:10 verdünnt)

Ergebnis: 129,9 nmol/Std./mgProtein =
spezifische Aktivität der HGPRT

Eichkurven:
Wie bei der ODC-Bestimmung wurden auch hier eine Zeit-und Enzymkonzentrationskurve erstellt.

2.5.8. Bestimmung der spezifischen Aktivität der Adenin-Phosphoribosyl-Transferase

Prinzip:
Die Adenin-Phosphoribosyl-Transferase(APRT) katalysiert die Reaktion von Adenin zu Adenosin-5-monophosphat.Diese Methode verläuft in der Durchführung und Berechnung genauso wie die HGPRT-Bestimmung.Der Unterschied besteht darin,daß man statt des Hypoxanthin-^{14}C Adenin-^{14}C in die Reaktion einbringt und analog dazu als Trägersubstanz statt IMP Adenosin-5-monophosphat verwendet,Die Adenin-^{14}C-Lösung ist 1,87mM. Sie wird 1:10 mit 1,87mM kalter Adenin-Lösung verdünnt.Die spezifische Aktivität lag bei 5,35µc/mmol.Die einzelnen Schritte der Bestimmung sind ansonsten dieselben wie bei der oben erklärten HGPRT-Methode. Auch hier zeigten Zeit-und Enzymkonzentrationseichkurven Linearität.

3.ERGEBNISSE

In den folgenden Tabellen 1-3 sind die Meßwerte der Versuchspersonen A,B und C aufgeführt.Die darauffolgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der drei Versuche jeweils im zeitlichen Ablauf.

Testperioden	24 h-Urin						Serum		Hämolysat		
	Tag	Urinvol. ml/die	HSu mg/die	OS mg/die	OP mg/die	Kreatinin g/die	Tag	HSs mg%	ODC	APRT	HGPRT
I	1	1720	369,8	1,0	19,8	1,43	1	4,4	0,091	14,7	84,3
	2	860	328,9	1,2	7,0	1,40					
	3	1040	327,6	1,2	6,9	1,60	3	4,05	0,096	16,2	76,3
II	4	670	224,5	6,2	10,2	1,18					
	5	910	234,3	18,8	36,4	1,46	5	3,5	0,127	21,9	80,5
	6	1230	199,9	26,0	100,0	1,46					
Allopurinol	7	820	186,6	19,0	134,0	1,52	7	2,3	0,115	23,1	72,7
	8	1140	179,6	17,8	80,0	1,31					
400mg/die	9	1220	186,1	20,5	106,0	1,32	9	2,5	0,146	18,1	81,3
	10	940	185,7	17,4	105,0	1,24					
	11	1100	231,0	19,4	95,3	1,62	11	2,35	0,183	18,3	73,8
	12	990	155,9	12,5	102,0	0,93					
	13	970	167,3	15,3	82,5	1,22	13	2,45	0,166	12,7	67,8
	14	1270	225,7	7,6	885,0	1,26					
III	15	1040	197,6	7,3	885,0	1,45	15	3,2	0,197	17,2	76,2
	16	2100	341,3	6,4	1040,0	1,18					
Allopurinol	17	1200	231,0	4,8	990,0	1,25	17	3,55	0,168	15,0	74,2
	18	1180	271,4	5,0	1100,0	1,19					
400mg/die +	19	1860	274,4	7,5	1100,0	1,08	19	4,05	0,184	10,2	69,0
	20	1300	286,0	9,1	1090,0	1,36					
Hypoxanthin	21	1730	272,5	8,3	1140,0	1,02	21	3,65	0,218	12,4	75,6
	22	1630	224,1	8,1	1050,0	1,13					
3g/die	23	1150	215,6	6,9	1070,0	1,23	23	3,6	0,150	19,9	68,5
	24	1250	309,4	5,3	960,0	1,27					
IV	25	1190	621,4	3,0	291,0	1,32	25	6,0	0,199	17,4	78,6
Hypoxanthin	26	1140	900,6	2,3	165,0	1,48					
3g/die	27	1200	597,0	1,7	114,0	1,41	27	10,8	0,190	14,4	74,5
	28	950	484,5	1,7	60,0	1,63					
							29	12,55	0,168	19,8	71,5

TABELLE 1 : Meßwerte VP"A"

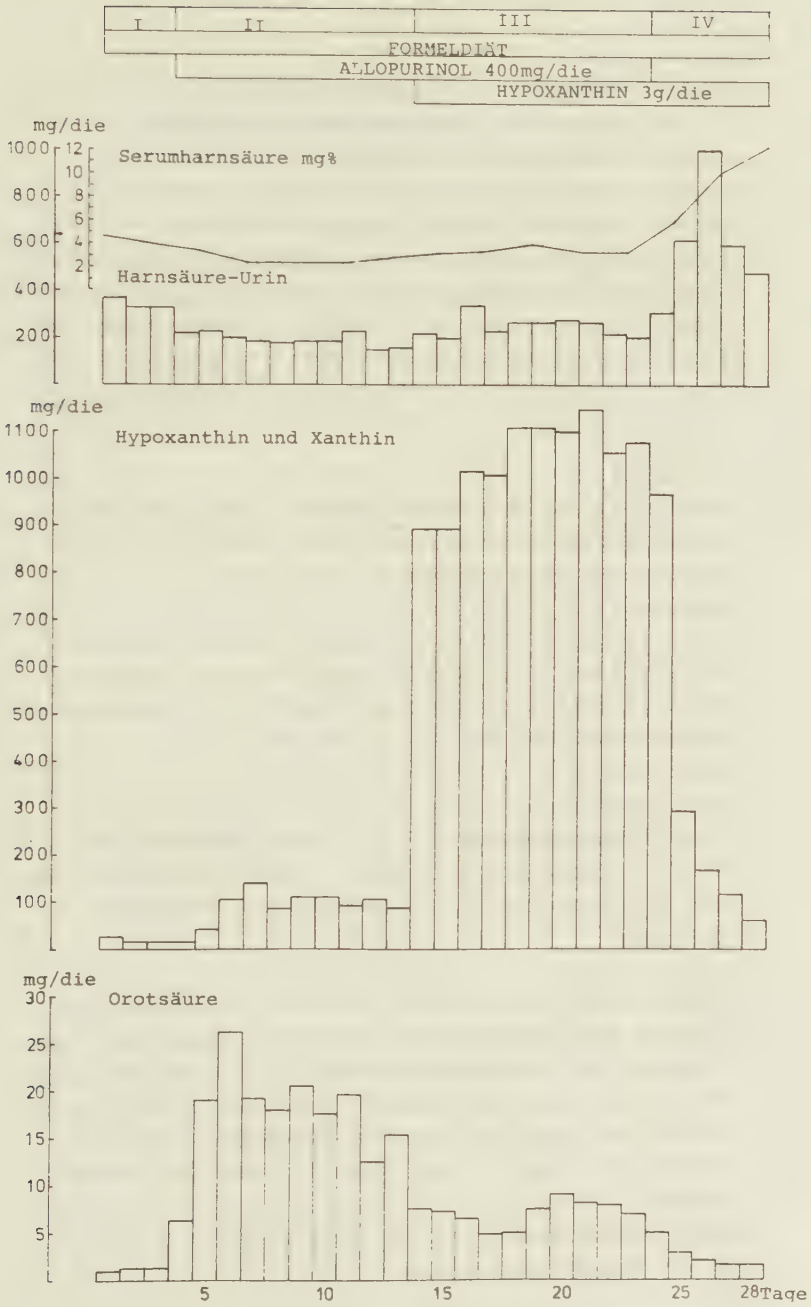


Abb.21: Ergebnisse VP"A"

3.1. Zusammenfassung der Ergebnisse VP"A"

Vereinfacht lassen sich die Ergebnisse der einzelnen Testperioden anhand der Mittelwerte folgendermaßen darstellen:

	I	II	III	IV
HS_U	342	195	254	582 mg/die
HS_S	4.2	2.6	3.6	9.8 mg%
OP	11.2	85.1	1035	318 mg/die
OS	1.1	17.4	7.1	2.8 mg/die
ODC	0.094	0.147	0.183	0.186nmol/Std/mg

Periode I:

Während dieser Beobachtungsperiode lagen die ermittelten Werte im Normbereich,VP"A" hielt sich an die Diät,Serum-und Urinharnsäure fielen ab.

Periode II:

Unter Allopurinol fiel die renale Harnsäureausscheidung(HS_U) auf 195mg/die.In derselben Zeit stieg die Oxypurinelimination(OP) auf 85mg/die,die Gesamtorotsäureausscheidung(OS) auf 17,4mg/die an.

Periode III:

Nach zusätzlicher Gabe von 3g Hypoxanthin ging die Orotsäureausscheidung auf 7,1 zurück,während die Harnsäureausscheidung um das 1,3-fache auf 254mg/die und die Oxypurine um das 12-fache auf 1035mg/die anstiegen.

Periode IV:

Absetzen des Allopurinols unter gleichzeitiger Fortführung der Hypoxanthingabe führte zu einem weiteren Rückgang der Orotsäureausscheidung auf 2,8mg/die,die Oxypurine fielen mit 318mg/die auf ein Drittel des vorherigen Wertes(1035mg/die) ab,während sich die Harnsäureelimination mit 582mg/die mehr als verdoppelte.

Die Serumharnsäure(HS_S) verhielt sich der Urinharnsäure(HS_U) analog.

Die Orotidyl-Decarboxylase stieg vom Zeitpunkt der Allopurinolgabe an von einem Ausgangswert von 0,094 kontinuierlich bis zu 0,186nmol/Std/mg Protein an. Die Kreatininausscheidung blieb relativ konstant im Normbereich bei einem mittleren Wert von 1,32g/die.

Die beiden Enzyme APRT und HGPRT zeigten keine wesentliche Änderung.Die Aktivität lag im Mittel für APRT bei 16,7 und für HGPRT bei 74,9nmol/Std/mg Protein.

Testperioden	24 h-Urin						Serum		Hämolysat	
	Tag	Urinvol. ml/die	HSu mg/die	OS mg/ die	OP mg/die	Kreatinin g/die	Tag	HS mg%	ODC	HGPRT
I	1	1120	330,4	1,0	3,8	0,86	1	3,4	0,064	100,3
	2	800	262,0	0,8	2,7	1,25				
	3	1070	246,1	1,2	17,8	0,99	3	2,9	0,063	95,8
II	4	1280	228,9	0,5	49,6	1,12				
	5	910	168,4	6,7	67,0	1,12	5	2,5	0,074	84,7
	6	740	120,3	8,5	71,7	1,14				
Allopurinol	7	1430	132,3	14,6	74,2	1,20	7	1,8	0,155	95,2
	8	1900	123,5	19,4	76,0	1,23				
400mg/die	9	1700	114,8	19,4	95,5	1,14	9	1,65	0,146	99,6
	10	780	118,9	14,1	91,0	1,21				
	11	1650	127,9	17,8	91,0	1,20	11	1,4	0,175	102,1
	12	1330	143,o	19,1	95,0	1,26				
	13	680	127,5	11,6	76,0	1,24	13	1,65	0,118	88,3
III	14	800	130,0	9,8	66,0	1,26				
	15	1120	142,8	12,2	95,0	1,37	15	1,75	0,186	86,1
Allopurinol	16	1880	122,2	11,3	103,0	1,15				
400mg/die	17	960	117,6	11,9	102,0	1,38	17	1,8	0,169	79,9
+	18	1050	133,9	10,4	97,0	1,18				
UMP 3g/die	19	1400	119,0	10,9	98,0	1,17	19	1,9	0,173	89,7
	20	1900	99,8	4,6	99,0	1,24				
	21	1200	108,0	4,3	96,0	1,35	21	1,35	0,162	75,7
	22	1520	102,6	4,2	88,0	1,03				
	23	1180	103,3	3,8	55,5	1,33	23	1,8	0,177	74,8
IV	24	1900	114,0	4,6	54,0	1,30				
	25	760	186,2	1,5	28,0	1,30	25	2,35	0,129	82,6
UMP 3g/die	26	900	190,0	1,2	23,1	0,94				
	27	1200	204,0	1,0	54,0	1,14	27	2,6	0,104	85,3
	28	1340	190,9	0,8	49,5	1,22				
							29	2,85	0,144	84,6

TABELLE 2 ; Meßwerte VP"B"

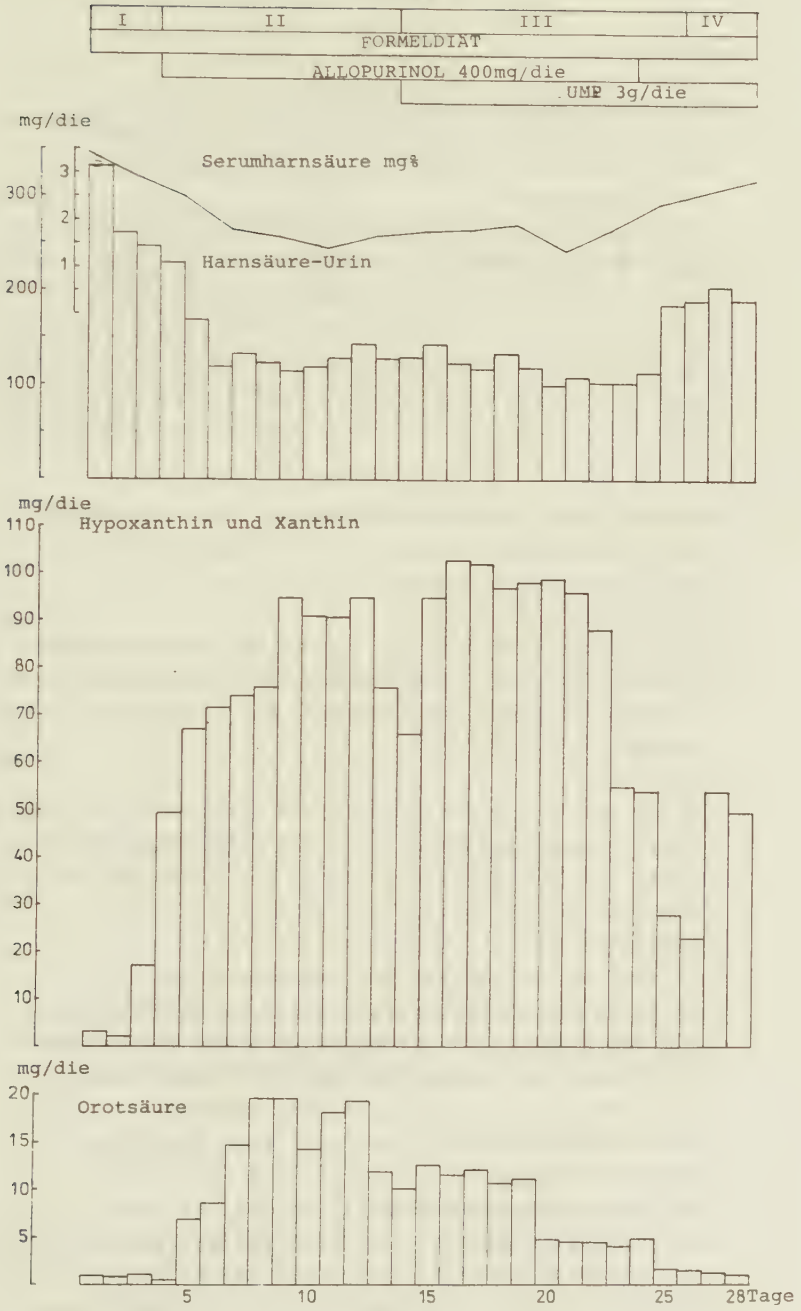


Abb.22: Ergebnisse VP"B"

3.2. Zusammenfassung der Ergebnisse VP"B"

Vereinfacht lassen sich die Ergebnisse der einzelnen Testperioden anhand der Mittelwerte folgendermaßen darstellen:

	I	II	III	IV
HS_U	280	141	118	177 mg/die
HS_S	3.2	1.8	1.7	2.6 mg%
OP	8.1	78.7	90.0	41.6mg/die
OS	1.0	13.2	8.9	1.8 mg/die
ODC	o.o64	o.134	o.173	o.126nmol/Std/mg

Periode I:
Während dieser Beobachtungsperiode lagen die ermittelten Werte im Normbereich,VP"B" hielt sich an die Diät,Serum-und Urinharnsäure fielen ab.

Periode II:
Unter Allopurinol fiel die renale Harnsäureausscheidung(HS_U) auf 141mg/die,während die Oxypurine(OP) auf 78,7mg/die und die Orotsäure(OS) auf 13,2mg/die anstiegen.

Periode III:
Die Zulage von 3g UMP verursachte einen Rückgang der Orotsäureelimination von 13,2 auf 8,9mg/die,gleichzeitig fiel die Harnsäure weiter auf 118mg/die und die Oxypurine stiegen weiter auf 90mg/die.

Periode IV:
Der Einfluß von UMP alleine bewirkte einen noch stärkeren Abfall der Orotsäure auf 1,8mg/die,während nach dem Wegfall der Allopurinolwirkung die Oxypurine auf 41,6mg/die zurückgingen und die renale Harnsäureausscheidung wieder auf 177mg/die anstieg.
Die Serumharnsäure(HS_S) verhielt sich analog der Urinharnsäure(HS_U).
Die Orotidyl-Decarboxylase stieg vom Zeitpunkt der Allopurinolgabe an von 0,064 auf o,173nmol/Std/mg Protein an,in Periode IV ging sie leicht zurück auf einen Wert von durchschnittlich 0,126nmol/Std/mg Protein.

Die tägliche Kreatininausscheidung blieb relativ konstant im Normbereich bei einem mittleren Wert von 1,19g/die.

Die HGPRT zeigte keine wesentliche Änderung,ihre Aktivität lag im Mittel bei einem Wert von 88,3 nmol/Std/mg Protein.

Testperioden	24 h-Urin						Serum		Hämolysat	
	Tag	Urinvol. ml/die	HSu mg/die	OS mg/die	OP mg/die	Kreatinin g/die	Tag	HSs mg%	ODC	HGPRT
I	1	1550	403,0	3,0	15,8	1,37	1	4,6	0,160	77,1
	2	1060	328,6	2,2	10,6	1,45				
	3	1440	374,4	2,9	19.2	1,71	3	3,85	0,120	65,1
II	4	960	364,8	2,2	6,4	1,54				
XMP 3g/die	5	900	735,8	2,2	7,5	1,48	5	5,3	0,115	73,6
	6	1060	824,2	2,1	7,1	1,65				
	7	1710	867,8	2,4	25,6	1,78	7	6,1	0,125	89,8
	8	1480	999,0	2,6	17,2	1,52				
III	9	1540	693,0	2,6	7,7	1,81	9	6,1	0,134	87,0
	10	1020	341,7	2,0	8,5	1,29				
	11	750	418,1	2,3	7,5	1,66	11	4,55	0,091	77,4
	12	1300	331,5	2,0	6,5	1,30				
	13	1180	359,9	2,4	18.0	1,64	13	3,55	0,098	81,6
IV	14	1290	270,9	16,0	45,0	1,33				
	15	1200	199,5	20,2	60,0	1,72	15	2,95	0,176	79,6
Allopurinol 400mg/die	16	1100	151,3	24,6	56,0	1,35				
	17	1000	197,5	30,2	50,0	1,66	17	2,25	0,192	76,9
	18	600	180,0	17,2	59,0	1,60				
V	19	630	207,9	9,1	6,3	1,50	19	2,0	0,266	85,3
	20	560	214,2	3,0	12,2	1,42				
	21	1400	227,5	3,6	21,0	1,70	21	2,8	0,139	83,2
	22	720	192,6	1,6	14,4	1,46				
	23	1090	291,6	2,4	10,9	1,57	23	3,35	0,122	78,9
							25	2,8	0,145	72,7

TABELLE 3 : Meßwerte VP"C"

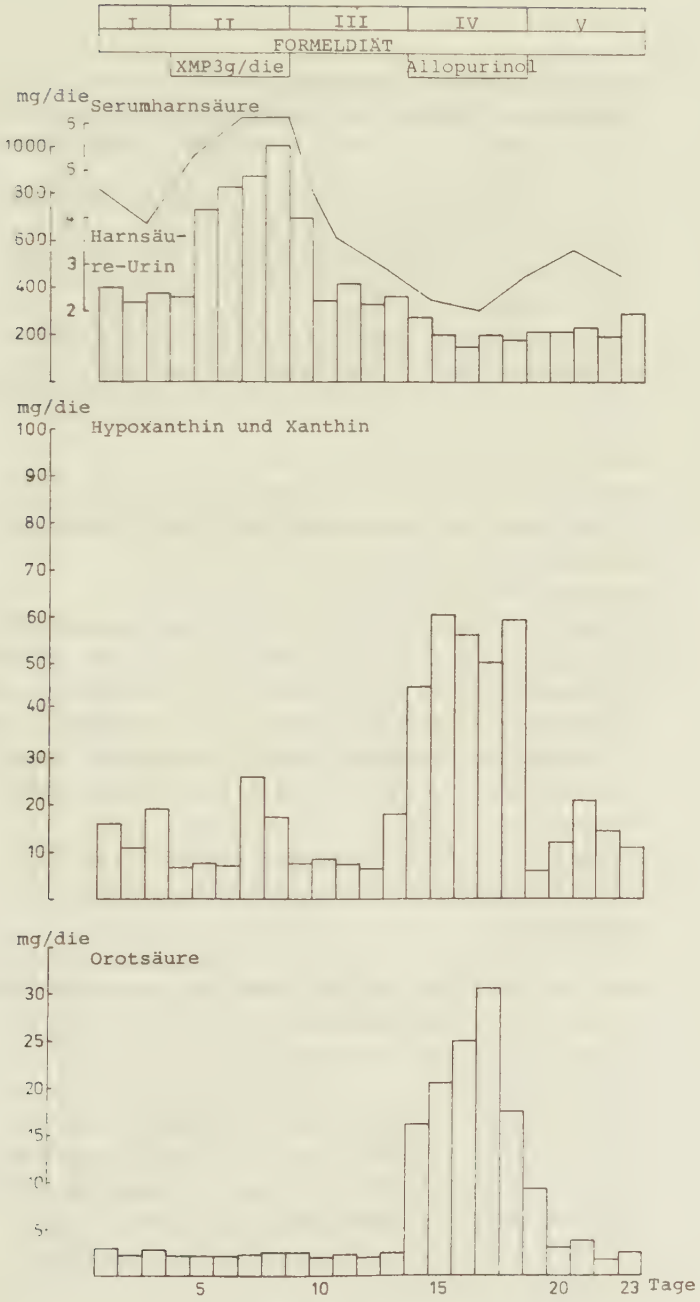


Abb.23: Ergebnisse VP"C"

3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse VP"C"

Vereinfacht lassen sich die Ergebnisse der einzelnen Testperioden anhand der Mittelwerte folgendermaßen darstellen:

	I	II	III	IV	V
HS_U	369	758	429	200	227 mg/die
HS_S	4.2	5.8	4.1	2.4	3.0 mg%
OP	15.2	12.8	9.6	63.0	13.0mg/die
OS	2.7	2.3	2.3	21.6	3.3 mg/die
ODC	0.140	0.120	0.108	0.184	0.168nmol/Std/mg

Periode I:

Während dieser Beobachtungsperiode lagen die ermittelten Werte im Normbereich,VP"C" hielt sich an die Diät,Serum-und Urinharnsäure fielen ab.

Periode II:

Unter XMP 3g/die stieg die renale Harnsäureausscheidung(HS_U) um mehr als das Doppelte von 369 auf 758mg/die an,ebenso erhöhte sich die Oxypurinelimination,was jedoch erst am Ende der Testperiode ersichtlich wurde und durch den Mittelwert nicht zum Ausdruck kommt. Die Orotsäure zeigte hier keinerlei Veränderungen.

Periode III:

In dieser Beobachtungsperiode näherten sich die Harnsäure und Oxypurine wieder ihren Ausgangswerten.

Periode IV:

Unter Allopurinol fiel die Harnsäureausscheidung um mehr als 50% von 429 auf 200mg/die,während die Oxypurine von 9,6 auf 63mg/die und die Orotsäure von 2,3 auf 21,6mg/die anstiegen.

Periode V:

Nach Absetzen des Allopurinols näherten sich die Werte allmählich wieder dem Normbereich,die Harnsäure stieg auf 227mg/die,die Oxypurine sanken wieder auf 13,0mg/die und die Orotsäureausscheidung auf 3,3mg/die ab.

Die Serumharnsäure(HS_S) verhielt sich analog der Urinharnsäure(HS_U).

Die tägliche Kreatininausscheidung blieb relativ konstant im Normbereich bei einem mittleren Wert von 1,55g/die.

Die Aktivität der Orotidyl-Decarboxylase änderte sich nur in Periode IV wesentlich,sie stieg hier aus dem Normbereich auf 0,184nmol/Std/mg Protein an.

Die HGPRT zeigte keine wesentliche Änderung,ihre Aktivität lag im Mittel bei 79,1nmol/Std/mg Protein.

D DISKUSSION

1. Versuchsablauf

Grundvoraussetzung für diesen Versuch war, daß die Versuchspersonen mit der Nahrung außer den Testsubstanzen keinerlei Purine oder Pyrimidine zu sich nahmen. Außerdem durfte der Tagesarbeitsumsatz zu keiner Beeinflussung des zu Beginn des Versuchs gemessenen Gewichts führen. Diese Bedingungen wurden erfüllt durch die Formeldiät. Der vorher errechnete Kalorienbedarf und die prozentualen Anteile an Grundnahrungsstoffen erwiesen sich als isoenergetisch, die Gewichtskurven der Versuchspersonen schwankten während der Testperioden um weniger als ± 1Kilogramm.

Diese flüssige Formeldiät erwies sich außerdem als vorteilhaft gegenüber anderen Diäten, weil sie angenehm milchähnlich schmeckte und so von den Versuchspersonen über die 23 bzw. 28 Tage als angenehm empfunden wurde. Sie war gut sättigend und bekömmlich und Nebenwirkungen wurden weder hier noch bei den einzelnen Testsubstanzen beobachtet.

Die jeweiligen Testperioden waren auf 5 bzw. 10 Tage angesetzt, wobei sich die 5 Tage bei der Untersuchung der XMP-Wirkung als nicht ganz ausreichend erwiesen, um ein gleichmäßiges Stadium zu erreichen.

Die Versuchspersonen führten ein Protokoll, aus dem ersichtlich wurde, daß keine größeren Schwankungen bezüglich Lebens- und Arbeitsgewohnheiten auftraten und daß sowohl Diät als auch Testsubstanzen regelmäßig und vollständig eingenommen worden waren. Das Sammeln des 24h-Urins bereitete weiter keine Schwierigkeiten. Die Konstanz von Urinvolumina, Körpergewicht und Kreatininausscheidung zeigte, daß sich die Versuchspersonen an die Versuchsbedingungen hielten.

2.Dosierung der Testsubstanzen

Allopurinol wurde in der üblichen therapeutischen Dosis von 400mg/die verabreicht;diese war ausreichend,um eine deutliche Erhöhung der Orotsäureausscheidung (Orotazidurie)zu bewirken.

Zur Dosierung der Testsubstanzen führte folgende Überlegung:Aus früheren Versuchen war bekannt,daß 4g/die RNS die durch Allopurinol induzierte Orotazidurie stark vermindern (71);daraufhin wurde jedes Nukleotid,das in RNS enthalten ist,einzeln in einer Dosierung von 1g/die getestet,was aber nie zu einem ähnlichen Effekt führte.Dies bewies lediglich,daß nicht nur ein Nukleotid für die Wirkung verantwortlich sein konnte.In diesem Test wurde nun die Dosis auf 3g/die erhöht und so versucht,eine den 4g/die RNS äquivalente Wirkung zu erzielen.Wie unten noch ausführlich erläutert, wurde jedoch auch mit dieser Dosierung der deutliche Effekt von 4g/die RNS in keinem Fall erreicht.

3.Interpretation der Ergebnisse

Bei der Auswertung der Proben aus der Beobachtungsperiode (I) ergaben sich bei allen drei Versuchspersonen Werte,die im angegebenen Normbereich lagen.Lediglich die Ergebnisse der mikroradiochemischen Bestimmungen der Aktivität von APRT und HGPRT lagen niedriger als erwartet.Kelley gibt für HGPRT 98±14nmol/Std/mgProtein und für APRT 31±6nmol/Std/mg Protein an,wir fanden Werte von 80±15 bzw. 17±6 nmol/Std/mg Protein.Eine Überprüfung dieses Tatbestands durch die Mitbestimmung einer Frischblutprobe (HGPRT 90,2) ergab,daß die Enzyme in den Erythrocyten der Testproben wahrscheinlich durch die Lagerung bei -20°C und mehrmaliges Auftauen an Aktivität verloren haben.Da jedoch alle Proben gleich lange gelagert wurden,ist trotzdem Vergleichbarkeit innerhalb der einzelnen Versuchspersonen gegeben.

Die alleinige Gabe von 400mg/die Allopurinol in den Perioden II"A",II"B" und IV"C"bestätigte die bereits beschriebenen Wirkungen:In allen drei Fällen sanken die Harnsäurewerte in Urin und Serum bis nahe zur Hälfte ab,gleichzeitig stieg die Ausscheidung von Xanthin und Hypoxanthin im Urin um das 7-10-fache an.Mit Sicherheit hat also hier das Allopurinol die Xanthinoxydase gehemmt,wodurch sich die Substrate des Enzyms, Hypoxanthin und Xanthin,vor dem Block anstauten und das Endprodukt der Xanthinoxydase,die Harnsäure,vermindert gebildet wurde.Auch die Wirkung des Allopurinols auf den Pyrimidinstoffwechsel fiel wie erwartet aus;die renale Orotsäureausscheidung stieg durchschnittlich um das 10-15-fache des Ausgangswertes an.Somit war eine ausreichende Orotazidurie eingetreten,die als Parameter für den Einfluß der Testsubstanzen auf den Pyrimidinstoffwechsel gelten konnte.
Die Orotidyl-Decarboxylase reagierte ebenfalls wie bekannt:Obwohl sie durch Allopurinol offensichtlich gehemmt wurde,was der Anstieg der Orotsäureausscheidung beweist,stieg ihre Aktivität bei Fortführung der Allopurinolgabe kontinuierlich an.Dieser Effekt wurde bereits früher beschrieben und von Gröbner und Kelley 1975 als Enzymstabilisierung aufgrund einer Änderung der Molekülgröße gedeutet(24).

-Hypoxanthin
Die durch Allopurinol experimentell induzierte Orotazidurie wurde durch die Zulage von 3g/die Hypoxanthin von 17,4 auf 7,1mg/die gesenkt.Dieser Effekt beweist deutlich,daß auch exogene Purinderivate imstande sind,die Pyrimidinsynthese zu hemmen.Über die Stelle dieser Hemmung können jedoch auch nach diesem Versuch nur Vermutungen angestellt werden.Die Aktivität der ODC blieb auch während dieser Phase auf der durch Allopurinol induzierten Höhe.

Das Hypoxanthin war offensichtlich gut resorbiert worden,denn die renale Oxypurinausscheidung stieg von 85 auf 1035mg/die stark an.Die Orotsäurewerte näherten sich ebenso wie die Oxypurinwerte in der IV.Periode nur allmählich wieder dem Normbereich, was auf der langen Halbwertszeit von Oxipurinol beruht.
Die spezifische Aktivität der HGPRT änderte sich während der gesamten Versuchszeit nicht,obwohl das Hypoxanthin ein direktes Substrat dieses Enzyms ist.
Die Aktivität der APRT blieb erwartungsgemäß unverändert.

-Uridin-5-monophosphat
Die Zulage von 3g/die UMP verursachte einen Rückgang der durch Allopurinol induzierten Orotaziduurie von 13,2 auf 8,9mg/die (Periode III).Unter alleiniger UMP-Gabe (Periode IV) kehrte die Orotsäureausscheidung in den Normbereich zurück.
Aus Bakterienstudien war bekannt,daß UMP eine Produkthemmung der ODC bewirken kann (16);bei Untersuchungen an Säugetieren wurde eine Endprodukthemmung der Carbamylphosphat-Synthetase durch UMP nachgewiesen (46).Das Verhalten der Orotaziduurie in den vorliegenden Untersuchungen spricht dafür,daß oral verabreichtes UMP im menschlichen Organismus vornehmlich eine Hemmung der Carbamylphosphat-Synthetase bewirkt;eine Hemmung der ODC ist demgegenüber nicht nachweisbar.
Die übrigen Parameter,Harnsäure und Oxypurine,wurden durch das UMP nicht beeinflußt,sie unterlagen der bekannten Allopurinolwirkung und näherten sich in Periode IV wieder ihren Normalwerten.
Die Aktivität der HGPRT zeigte erwartungsgemäß keine wesentliche Änderung.

-Xanthosin-5-monophosphat
Beardmore und Kelley hatten festgestellt,daß Xanthin-und Allopurinolribonukleotide in vitro ausgeprägte Inhibitoren der ODC sind (3).In dieser Arbeit sollte nun überprüft werden,ob diese Wirkung für das XMP auch in vivo zutrifft.Es ging also nicht darum,das XMP während einer Orotazidurie zu testen,sondern vielmehr darum, dessen Einfluß auf die Orotsäureausscheidung dem Einfluß von Allopurinol gegenüberzustellen. Infolgedessen zeigte der Versuchsaufbau zwei getrennte Perioden,in denen jeweils 3g/die XMP und 400mg/die Allopurinol gegeben wurden.Während unter Allopurinol die bekannte Orotazidurie eintrat,kam es unter XMP zu keiner Steigerung der renalen Orotsäureauscheidung,die Werte lagen unverändert bei einem Mittel von 2,3mg/die.Dies läßt sich in Anbetracht der guten Resorption (starker Anstieg der Harnsäure in Serum und Urin) nur so erklären,daß die Verbindung metabolisiert wurde.

Zusammenfassend konnte somit nachgewiesen werden, daß Hypoxanthin und UMP in einer Dosierung von 3g/die zu einer deutlichen Verminderung der durch Allopurinol induzierten Orotazidurie führen.

Testsubstanz	Dosis	Orotsäureausscheidung (mg/die)			
		Allopurinol	+Testsubstanz	Differenz	Hemmung
RNS	4g ≙ 12,4mmol	19	6	13	68%
Hypoxanthin	3g ≙ 22 mmol	17,4	7,1	10,3	59%
UMP	3g ≙ 9,3mmol	13,2	8,9	4,3	33%

Zum Vergleich sind in der ersten Rubrik die von Zöllner und Gröbner 1971 gefundenen Ergebnisse von 4g/die RNS aufgezeigt (71).Die Wirkung von

3g/die Hypoxanthin und UMP war der von 4g/die RNS zwar nicht äquivalent,der Abfall der Orotazidurie um 59 bzw.33% muß jedoch auch hier als Beweis dafür gelten,daß diese beiden Substanzen die Pyrimidinsynthese de novo beeinflussen.

Für das UMP ist eine Endprodukthemmung der Carbamylphosphat-Synthetase bekannt.Hiermit in Einklang steht auch die klinische Beobachtung, daß bei der hereditären Orotazidurie die Gabe von Uridin zu einer deutlichen Abnahme der Orotsäureausscheidung führt (5,30).

Auf welchem Weg auch die Purinbase Hypoxanthin zu einer Hemmung der Pyrimidinsynthese führt, ist weitgehend unbekannt.Diese Ergebnisse sprechen jedoch erneut für eine enge Beziehung zwischen Purin-und Pyrimidinstoffwechsel.

Das XMP,das sich in vitro als ein ausgeprägter Hemmer der ODC gezeigt hatte (3),wurde hier erstmals in vivo eingesetzt.Die erwartete Wirkung trat jedoch nicht ein,weder die Aktivität der ODC noch die renale Orotsäureausscheidung veränderten sich.Möglicherweise wurde die Verbindung metabolisiert.

E ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen einer größeren Untersuchungsreihe wurde in dieser Arbeit bei drei Versuchspersonen die Beeinflussung des Pyrimidinstoffwechsels durch oral verabreichtes Hypoxanthin(HX),Uridin-5-monophosphat(UMP) und Xanthosin-5-monophosphat(XMP) untersucht.Als Modell diente die durch Allopurinol induzierte Orotazidurie, die eine Stoffwechselkrankheit,die hereditäre Orotazidurie,simuliert.

Drei gesunde Versuchspersonen im Alter von 20-23Jahren ernährten sich für die Dauer des Tests von einer flüssigen Formeldiät,die frei von Purinen war.Diese bestand zu 55% aus Kohlehydraten,zu 30% aus Fett und zu 15% aus Eiweiß.Die tägliche Kalorienzufuhr berechnete sich aus Geschlecht,Körperoberfläche und körperlicher Betätigung und war somit isoenergetisch.

Um den Einfluß der Testsubstanzen beurteilen zu können, wurden neben der täglichen Orotsäureausscheidung und der parallel dazu bestimmten Aktivität der Orotidyl-Decarboxylase in den Erythrocyten noch folgende Parameter gemessen:Harnsäure in Urin und Serum,Kreatinin, Hypoxanthin und Xanthin im Urin,sowie die Enzyme APRT und HGPRT in den Erythrocyten.

Der Versuchsablauf gestaltete sich aufgrund der Problemstellung unterschiedlich.Bei zwei Versuchspersonen A und B sollten,nachdem sie durch eine zehntägige Einnahme von 400mg Allopurinol/die eine gleichmäßige Orotazidurie entwickelt hatten,die Substanzen HX und UMP in einer Dosierung von 3g/die zugelegt werden und deren Einfluß auf die Orotsäureausscheidung beobachtet werden.Bei der dritten Versuchsperson C war der Versuchsablauf in zwei voneinander getrennte Perioden eingeteilt,wobei zuerst 3g/die XMP und dann 400mg/die Allopurinol gegeben wurden.

Vom XMP war bisher nur bekannt,daß es in vitro,ebenso wie die Allopurinolderivate,ein starker Inhibitor der ODC ist.Es sollte nun erstmals in vivo getestet werden, ob es in der Lage ist,eine dem Allopurinol vergleichbare Orotazidurie zu bewirken.

Den deutlichsten Effekt auf die durch Allopurinol induzierte Orotazidurie bewirkte die Purinbase Hypoxanthin.Bei Gabe von 3g/die HX sank die renale Orotsäureausscheidung von 17,4 auf 7,1 mg/die um 59%.Damit konnte gezeigt werden,daß auch Purinderivate in die Regulation des Pyrimidinstoffwechsels eingreifen und somit enge Beziehungen zwischen Purin-und Pyrimidinstoffwechsel bestehen müssen.Der Angriffspunkt für diese Hemmung durch Purine ist allerdings unbekannt.

Bei Gabe von 3g/die UMP sank die durch Allopurinol induzierte Orotazidurie von 13,2 auf 8,9mg/die,um 33%. Dieser Effekt deckt sich mit der klinischen Beobachtung,daß bei Patienten mit hereditärer Orotazidurie die Gabe von Uridin zu einer deutlichen Abnahme der Orotsäureausscheidung im Urin führt (5,30).Als Erklärung hierfür dient die Endprodukthemmung des ersten spezifischen Enzyms der Pyrimidinsynthese,der Carbamylphosphat-Synthetase.

Während der Einnahme von 3g/die XMP veränderten sich weder die Orotsäureausscheidung noch die spezifische Aktivität der ODC.Das Nukleotid war zwar gut resorbiert worden,wahrscheinlich aber war die Verbindung metabolisiert worden.

Die spezifische Aktivität der ODC wurde von keiner der drei Substanzen eindeutig beeinflußt.Das Enzym wurde zwar durch das Allopurinol gehemmt,was die Orotazidurie beweist,die Aktivität stieg aber bei Fortführung der Allopurinolgabe kontinuierlich an.Dies wird auf eine Enzymstabilisierung zurückgeführt (24).HGPRT und APRT zeigten ebnefalls keine Änderung der Aktivität.

Zusammenfassend läßt sich also sagen,daß Hypoxanthin und Uridin-5-monophosphat zu einer partiellen Aufhebung der experimentell induzierten Orotazidurie führen.Xanthosin-5-monophosphat allein,ohne Allopurinol gegeben,führt zu keiner Beeinflussung der renalen Orotsäureausscheidung.

LITERATURVERZEICHNIS

1) BEARDMORE T. D., CASHMAN J. S., KELLEY W. N.:
Mechanism of allopurinol-mediated increase in enzyme activity in man.
J. clin. Invest. 51, 1823 (1972)

2) BEARDMORE T. D., FOX I. H., KELLEY W. N.:
Effect of allopurinol on pyrimidine metabolism in the Lesch-Nyhan-Syndrome.
Lancet. 2, 830 (1970)

3) BEARDMORE T. D., KELLEY W. N.:
Mechanism of allopurinol-mediated inhibition of pyrimidine biosynthesis.
J. Lab. clin. Med. 78, 696 (1971)

4) BECKER M. A., MEYER L. J., WOOD A. W., SEEGMILLER J. E.:
Gout with purine overproduction resulting from PrPP synthetase activity.
Clin. Res. 21, 217 (1973)

5) BECROFT D. M. O., PHILLIPS L. I.:
Hereditary orotic aciduria and megaloblatic anaemia: A second case with response to uridine.
Brit. med. J. 1, 547 (1965)

6) BRESNICK E., BLATCHFORD K.:
Inhibition of Dihydroorotase by Purines and Pyrimidines.
Biochem. Biophys. Acta 81, 150 (1964)

7) CHARGAFF E., DAVIDSON J. N.:
The Nucleic Acids, Bd. III

Academic Press New York (1960)

8) CHOW D. C., KAWAHARA F. S., SAMIDERS T., SORENSEN L. E.:
A new assay method for hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase.

J. Lab. Clin. Med. 76, 5, 733 (1970)

9) DUBOIS D., DUBOIS E. F.:
Wissenschaftliche Tabellen.

Documenta Geigy

10) ELION G. B., CALLAHAN S., NATHAN H., BIEBER S., RUNDLES R. W., HITCHINGS G. H.:
Enzymatic and metabolic studies with allopurinol.

Ann. rheum. Dis. 25, 608 (1966)

11) FALLON H. J., FREI E., BLOCK J., SEEGMILLER J. E.:
The uricosuria and orotic aciduria induced by 6-azauridine.

J. clin. Invest. 40, 1906 (1961)

12) FLAKS J. G., ERWIN M. J., BUCHANAN J. M.:
Biosynthesis of the purines. XVI . The synthesis of adenosine-5-phosphate and 5-amino-4-imidazole-carboxamide ribotide by an nucleotide phosphorylase.

J. Biol. Chem. 228, 201 (1957)

13) FOX R. M., WOOD M. H., O'SULLIVAN W. J.:
Studies on the coordinate activity and lability of orotidylate phosphoribosyltransferase and decarboxylase in human erythrocytes,and the effects of allopurinol administration.

J. clin. Invest. 50, 1050 (1971)

14) FOX R. M., ROYSE-SMITH D., O'SULLIVAN W. J.:
Orotidinuria induced by allopurinol.
Science 168, 861 (1970 b)

15) FOX R. M., O'SULLIVAN W. J., FIRKIN B. G.:
Orotic aciduria differing enzyme patterns.
Amer. J. Med. 47, 332 (1969)

16) FOX R. M., WOOD M. H., O'SULLIVAN D., O'SULLIVAN W. J.:
Hereditary orotic aciduria: types I and II.
Amer. J. Med. 55, 791 (1973)

17) FOX I. H., WYNGAARDEN J. B., KELLEY W. N.:
Depletion of erythrocyte phosphoribosylpyrophosphate in man, a newly observed effect of allopurinol.
New. Engl. J. Med. 283, 1177 (1970 a)

18) GOODMAN L. S., GILMAN A.:
The pharmacological basis of therapeutics.
4th ed. The Macmillan Company (1971)

19) GOTS J. S.:
Regulation of purine and pyrimidine metabolism.
Metabolic Regulation.Vol.5 Edited by H.J.Vogel.
Academic Press New York 225-255 (1971)

20) GRÖBNER W., ZÖLLNER N.:
Die Gicht.
Bayerisches Arzteblatt 2, 115 (1978)

21) GRÖBNER W., ZÖLLNER N.:
Moderne Aspekte zur Pathophysiologie der familiären Hyperurikämie.
Med. Technik 5, 94 (1975)

22) GRÖBNER W., ZÖLLNER N.:
Störungen des menschlichen Pyrimidinstoffwechsels.
Münch. med. Wschr. 37, 1453 (1975)

23) GRÖBNER W., ZÖLLNER N.:
Zur Beeinflussung der Purin- und Pyrimidinsynthese durch Allopurinol.
Klin. Wschr. 53, 255 (1975)

24) GRÖBNER W., KELLEY W. N.:
Effect of allopurinol and its metabolic derivates on the configuration of human orotate phosphoribosyltransferase and orotidine-5-phosphate-decarboxylase.
Biochem. Pharmacol. 24, 379 (1975)

25) HAGER S. E., JONES M. E.:
Initial steps in pyrimidine synthesis in Ehrlich-Ascites-Carcinoma in vitro. I. Factors affecting the incorporation of ^{14}C-bicarbonate into carbon 2 of the uracil ring of the acid-soluble nucleotides of intact cells.
J. Biol. Chem. 240, 4556 (1965)

26) HARTMAN S. C., BUCHANAN J. M.:
Biosynthesis of the purines. XXI. 5-Phosphoribosyl-pyrophosphate amidotransferase.
J. Biol. Chem. 233, 451 (1958)

27) HARTMAN S. C.:
Purines and Pyrimidines: In "Metabolic Pathways" (D. M. GREENBERG ed.)
3. Aufl. 4, 1-53, Academic Press New York (1971)

28) HOLMES E. W., McDONALD J. A., McCORD J. M., WYNGAARDEN J. B., KELLEY W. N.:
Human glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase: Kinetic and regulatory properties.

J. Biol. Chem. 248, 144 (1973)

29) HOOGENRAAD D. J., LEVINE R. L., KRETCHMER N.:
Copurification of carbamoyl phosphate synthetase and aspartate transcarbamoylase from mouse spleen.

Biochem. Biophys. Res. 45, 796 (1971)

30) HUGULEY C. M., BRAIN J. A., RIVERS S. L., SCOGGINS R. B.:
Refractory megaloblastic anemia associated with excretion of orotic acid.

Blood 14, 615 (1959)

31) ITO K., NAGANISHI S., TERADA M., TATIBANA M.:
Control of pyrimidine biosynthesis in mammalian tissues. II. Glutamine-utilizing carbamylphosphate synthetase of various experimental tumors: Distribution, purification and characterisation.

Biochem. Biophys. Acta 220, 477 (1970)

32) JONES M. E.:
Regulation of pyrimidine and arginine biosynthesis in mammals.

Adv. Enzyme Regul. 9, 19 (1971)

33) JONES O. W., ASHTON D. M., WYNGAARDEN J. B.:
Accelerated turnover of phosphoribosylpyrophosphate, a purine nucleotide precursor, in certain gouty subjects.

J. clin. Invest. 41, 1805 (1962)

34) KARLSON P.:
Lehrbuch der Biochemie 8.Auflage,
Thieme, Stuttgart (1972)

35) KELLEY W. N.:
Purine and pyrimidine metabolism of cells in culture. Growth, nutrition and metabolism in cells in culture.
Acad. Press. Ind. New York-London 1 (1972)

36) KELLEY W. N., BEARDMORE T. D.:
Allopurinol: Alteration in pyrimidine metabolism in man.
Science 169, 388 (1970)

37) KELLEY W. N., WYNGAARDEN J. B.:
Effects of dietary purine restriction, allopurinol and oxipurinol on the urinary excretion of ultraviolet-absorbing compounds.
Clin. Chem. 16, 707 (1970)

38) KELLEY W. N., GRÖBNER W., HOLMES E.:
Current concepts in the pathogenesis of hyperuricemia.
Metabolism 22, 939 (1973)

39) KERSON L. A., APPEL S. H.:
Kinetic studies on rat liver carbamylphosphate-synthetase.
J. Biol. Chem. 243, 4279 (1968)

40) KLINENBERG J. P., GOLDFINGER S., BRADLEY K. H., SEEGMILLER J. E.:
An enzymatic spectrophotometric method for the determination of xanthine and hypoxanthine.
Clinical Chemistry 13, 833 (1967)

41) KORN E. D., REMY C. N., MASILEJKO H. C., BUCHANAN J. M.:
Biosynthesis of the purines. VII. Synthesis of nucleotides from bases by partially purified enzymes.
J. Biol. Chem. 217, 875 (1955)

42) KORNBERG A., LIEBERMAN I., SIMMS E. S.:
Enzymatic synthesis and properties of 5-phosphoribosylpyrophosphate.
J. Biol. Chem. 215, 389 (1955)

43) KRENITSKY T. A., ELION G. B., STRELITZ R. A., HITCHINGS G. H.:
Ribonucleosides of allopurinol and oxoallopurinol.
J. Biol. Chem. 242, 2675 (1967)

44) LEVENBERG B.:
Role of L-glutamine as donor of carbamyl nitrogen for the enzymatic synthesis of citrulline in agaricus bisporus.
J. Biol. Chem. 237, 2590 (1962)

45) LEVINE B., ABRAHAM J. M., OBERHOLZER V. G., BURGESS E. A.:
Hyperammonaemia: a deficiency of liver ornithine transcarbamylase.
Arch. Dis. Childh. 44, 152 (1969)

46) LEVINE R. L., HOOGENRAAD N. J., KRETCHMER N.:
Regulation of activity of carbamylphosphate-synthetase from mouse spleen.
Biochemistry 10, 3694 (1971)

47) LLOYD H., SMITH L. H. Jr.:
Pyrimidine metabolism in man.
New Engl. J. Med. 288, 764 (1973)

48) LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. Y., FARR L. A., RANDALL R. J.:
Proteine Determination with Foline-Ciocalteus Reagens.

J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

49) MATSUDA I., ARASHIMA S., NAMBU H. et al:
Hyperammonaemia due to a mutant enzyme of ornithine transcarbamylase.

Pediatrics 48, 595 (1971)

50) McCOLLISTER R. J., GILBERT W. R., ASHTON D. M., WYNGAARDEN J. B.:
Pseudofeedback inhibition of purine synthesis by 6-mercaptopurine ribonucleotide and other purineanalogues.

J. Biol. Chem. 239, 1560 (1964)

51) NEIMANN N., NAJEAU Y., SCIALOM C., BOULARD M., PIERSON M., BERNARD J.:
Étude d'un cas d'anémie megaloblastique de l'enfant avec excretion anormale d'acide orotique.

Nouv. Rev. franc. Hémat 5, 445 (1965)

52) POPPER H. E., MANDEL E., MAYER H.:
Zur Kreatininbestimmung im Blute.

Biochem. Z. 291, 354 (1937)

53) REMY C. N., REMY W. T., BUCHANAN J. M.:
Biosynthesis of the purines. VIII. Enzymatic synthesis and utilization of a-5-phosphoribosylpyrophosphate.

J. Biol. Chem. 217, 885 (1955)

54) ROGERS L. E., PORTER F. S.:
Hereditary orotic aciduria, a urinary screening test.
Pediatrics 42, 423 (1968)

55) ROGERS L. E., WARFORD L. R., PATTERSON R. B., PORTER F. S.:
Hereditary orotic aciduria: I. A new case with family studies.
Pediatrics 42, 415 (1968)

56) RUNDLES R. W., WYNGAARDEN J. B., HITCHINGS G. H., ELION G. B., SILBERMAN H. R.:
Effects of a xanthine oxidase inhibitor on thiopurine metabolism, hyperuricemia and gout.
Trans. Ass. Amer. Phys. 76, 126 (1963)

57) SEEGMILLER J. E., ROSENBLOOM F. M., KELLEY W. N.:
Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis.
Science 155, 1682 (1967)

58) SIEGENTHALER W.:
Klinische Pathophysiologie, 2.Auflage.
Thieme, Stuttgart (1973)

59) SMITH L. H. Jr., HUGULEY C. M. Jr., BRAIN J. A.:
Hereditary orotic aciduria. The metabolic basis of inherited disease. Third edition.
Edited by STANBURY J. B., WYNGAARDEN J. B., FREDRICKSON D. S. 1003, McGraw-Hill, New York (1972)

60) SPERLING D., BOER O., PERSKY-BROSH S., KANAREK E., DE VRIES A.:
Altered kinetic property of erythrocyte phosphoribosylpyrophosphate synthetase in excessive purine production.
Europ. J. Clin. Biol. Res. 17, 703 (1972)

61) THANNHAUSER S. J.:
Lehrbuch des Stoffwechsels und der Stoffwechselkrankheiten, 2.Aufl., hsg. von N.ZÖLLNER.
Thieme, Stuttgart (1952)

62) WEISSMAN S. M., EISEN A. Z., FALLON H. et al.:
The metabolism of ringlabeled orotic acid in man.
J. Clin. Invest. 41, 1546 (1962)

63) WEISSMAN S. M.:
Human pyrimidine metabolism.
JAMA 195, 27 (1966)

64) WYNGAARDEN J. B., ASHTON D. M.:
The Regulation of activity of phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase by purine ribonucleotides: A potential feedback control of purine biosynthesis.
J. Biol. Chem. 234, 1492 (1959)

65) WYNGAARDEN J. B., KELLEY W. N.:
Gout: The metabolic basis of inherited disease. Third Edition.
Edited by STANBURY J. B., WYNGAARDEN J. B., FREDRICKSON D. S. 889, McGraw-Hill, New York (1972)

66) YATES R. A., PARDEE A. B.:
Control of pyrimidine biosyntnesis in escnericnia coli by a feed-back mechanism.
J. Biol. Chem. 221, 757 (1956)

67) YATES R. A., PARDEE A. B.:
Control by uracil of formation of enzymes required for orotate synthesis.
J. Biol. Chem. 227, 677 (1957)

68) ZÖLLNER N., GRÖBNER W., RAUCH-JANSSEN A.:
The effect of different purines and pyrimidines on human pyrimidine biosynthesis.
Purine metabolism in man II.
Plenum Publishing Corporation (1977)

69) ZÖLLNER N.:
Eine einfache Modifikation der enzymatischen Harnsäurebestimmung.
Z. klin. Chem. 1, 178 (1963)

70) ZÖLLNER N., JANSSEN A., GRÖBNER W.:
Partielle Aufhebung der Allopurinolinduzierten Orotacidurie durch Ribonucleotide.
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 81, (1975)

71) ZÖLLNER N., GRÖBNER W.:
Influence of oral ribonucleic acid on orotaciduria due to allopurinol administration.
Z. ges. exp. Med. 156, 317 (1971)

LEBENSLAUF

Am 5.September 1952 wurde ich als Tochter des Dr.med.dent.Heinz Borchardt und seiner Ehefrau Gisela,geb.Olfenius,in Augsburg geboren.
Meine 4 Volksschuljahre verbrachte ich in Gersthofen bei Augsburg.1962 wurde ich in das A.B.von Stettensche Institut,Neusprachliches Gymnasium,in Augsburg aufgenommen,an dem ich nach dem Besuch von 9 Klassen am 19.Juni 1971 die Reifeprüfung ablegte.
Im Wintersemester 1971 wurde ich zum Medizinstudium an der LMU München zugelassen.Nach dem Krankenpflegepraktikum und den vorklinischen Semestern bestand ich 1972 das Vorphysikum und 1974 das Physikum.Es folgten die klinischen Semester mit den drei Abschnitten der ärztlichen Prüfung.Am 12.Mai 1978 wurde mir die Approbation als Arzt erteilt.Seit September 1978 arbeite ich als Assistenzärztin in der II.Chirurgischen Klinik in Augsburg bei Herrn Professor Baumgartl.